



TITLE:

マウス胚中心B細胞におけるシアル  
酸分子種の変化とその生理的意義(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

内藤, 裕子

---

CITATION:

内藤, 裕子. マウス胚中心B細胞におけるシアル酸分子種の変化とその  
生理的意義. 京都大学, 2007, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2007-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k13315>

RIGHT:

マウス胚中心 B 細胞における  
シアル酸分子種の変化とその生理的意義

2 0 0 7 年

内 藤 裕 子

# 目次

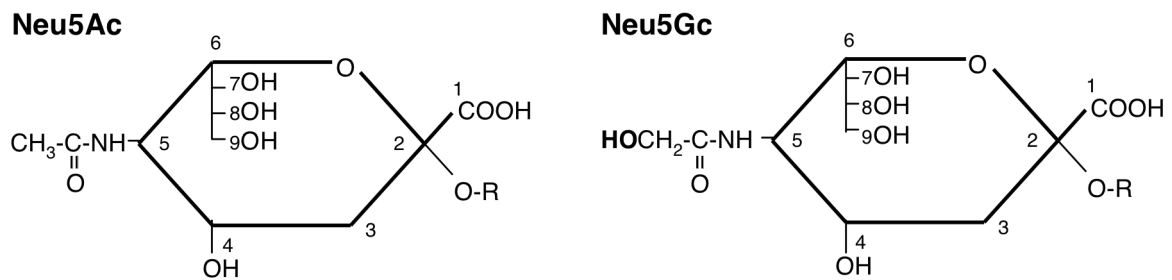
序論	1
第一章 GL7 エピトープの同定	5
第一節 GL7 はヒト B 細胞株にも結合する	5
第二節 GL7 のエピトープはシアル酸を含む <i>N</i> -結合型糖鎖である	7
第三節 GL7 は $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む糖鎖を認識する	10
第四節 GL7 は Sia $\alpha$ 2-6LacNAc を認識する	14
第五節 考察と総括	15
第六節 実験方法	16
第二章 胚中心 B 細胞におけるシアル酸分子種の変化	20
第一節 胚中心 B 細胞では主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へと変化する	22
第二節 <i>Cmah</i> の発現は LPS blast において mRNA レベルで減少する	23
第三節 考察と総括	25
第四節 実験方法	27
第三章 <i>N</i> -グリコリルノイラミン酸欠損マウスの解析	31
第一節 <i>Cmah</i> ノックアウトマウスにおけるリンパ球の発達は正常である	31
第二節 <i>Cmah</i> ノックアウトマウスでの胚中心の形成は正常である	32
第三節 <i>Cmah</i> ノックアウトマウスでは T 細胞非依存性抗原による免疫時の抗体産生が亢進している	34
第四節 <i>Cmah</i> ノックアウトマウスでは B 細胞の増殖が亢進している	36
第五節 <i>Cmah</i> ノックアウトマウスでは Siglec リガンドの発現量に変化している	37
第六節 <i>Cmah</i> ノックアウトマウスの B 細胞受容体刺激時のチロシンリン酸化は正常である	40
第七節 考察と総括	42
第八節 実験方法	45
結論	50
謝辞	51
引用文献	52

## 序論

糖鎖修飾は翻訳後修飾の代表的なものであり、全タンパク質の 50%以上が糖鎖修飾を受けていると考えられている。DNA やペプチド鎖が単純な構造を持ち、動物種を超えて普遍的なものであるのに対し、糖鎖の構造は非常に多様性に富んでおり、細胞の顔であるとも言われる。細胞種特異的な糖鎖構造が見られることも多く、免疫系においても古くから糖鎖に結合するタンパク質である植物レクチンが細胞の分類に使われてきた。これら多様な糖鎖は、単に飾りとしてタンパク質に付加されているわけではなく、糖鎖修飾を受けたタンパク質自身の機能を制御したり、糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンのリガンドとして働くことでシグナル伝達に関与したりすることが知られている。近年、糖鎖が発生・分化(19, 40, 42)、タンパク質の品質管理(17)、免疫機能の制御(15)など様々な生命現象において重要な役割を担っていることが明らかにされつつあり、また糖鎖異常がもたらす疾患も多く報告されている(38, 76)。

シアル酸 (Sia) は *N*-結合型糖鎖、*O*-結合型糖鎖および糖脂質の非還元末端、つまり糖鎖部分の一番外側に存在する炭素 9 個からなる酸性糖である(58)。シアル酸の生合成の初期段階に関わる酵素、UDP-GlcNAc 2-epimerase のノックアウトマウスが胎生 9 日頃に致死となることが明らかにされるなど(61)、シアル酸は生体にとって不可欠な成分であることが知られている。シアル酸は細胞表面に負電荷を与えているばかりでなく、その存在位置が糖鎖の末端であることからレクチンをはじめとする糖鎖結合分子の標的となり、細胞間および同一細胞上の様々な分子間認識において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた(70)。生体内にはリンパ球のホーミングなどに関わる C 型レクチンのセレクトインファミリー(28, 69)や、細胞内シグナル伝達などに関わる I 型レクチンのシグレック (Siglec) ファミリー(71)などのシアル酸認識レクチンが存在する。一方、インフルエンザウイルスをはじめとする病原体による宿主認識にもシアル酸は利用されてきた(64)。シアル酸がこれらの分子間認識に利用されるには、糖鎖の末端に存在するというだけでなく、シアロ糖鎖 (シアル酸を含む糖鎖) のもつ多様性が重要な意味をなしていると考えられる。シアロ糖鎖は、シアル酸とその還元末端側の糖鎖との間に複数の結合様式が存在することに加え、シアル酸自身がアセチル化や硫酸化、メチル化、ラクチル化などの修飾を受け、50 種を超える分子種が存在することにより、類いまれな多様性をもつ(1, 67)。このような多様性は他の単糖には見られず、シアル酸の特徴の一つである。

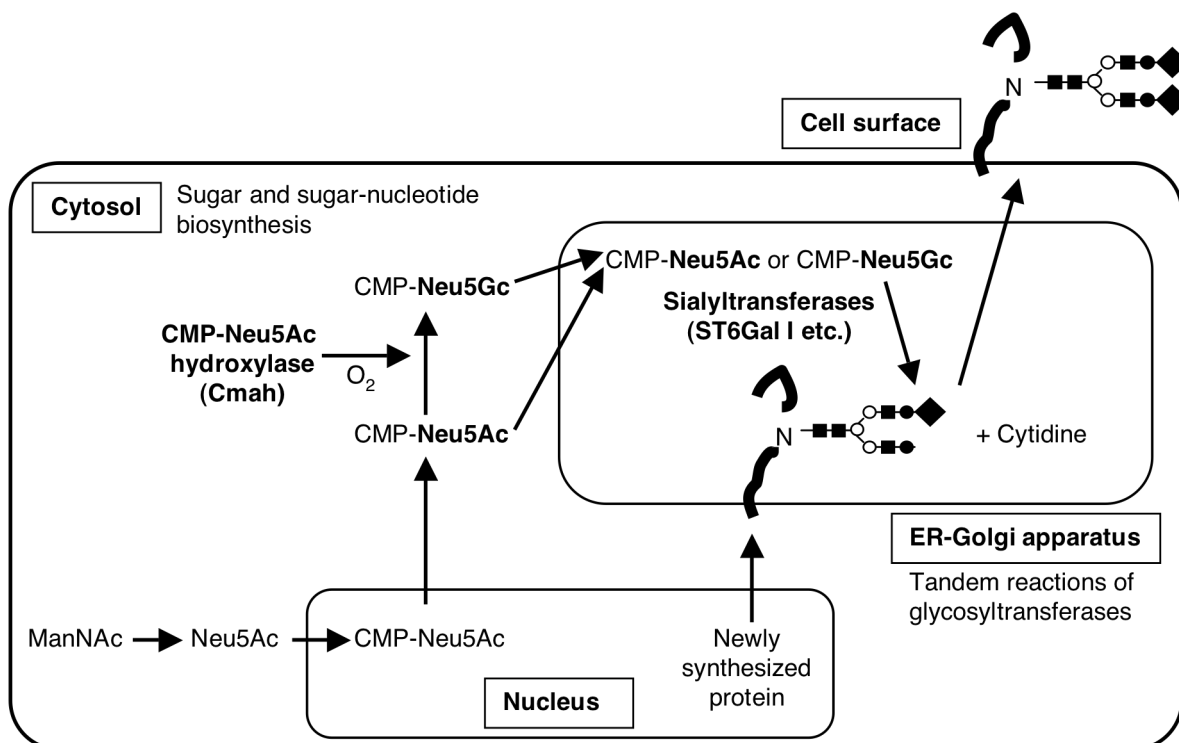
このように多様性に富むシアル酸であるが、その多くの分子種が *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) を前駆体として生合成される。生体内における主要シアル酸分子種は、Neu5Ac



**Figure 0-1 Structures of two major molecular species of sialic acid.**

The metabolic precursor *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and its modified form *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) differ only by an oxygen atom at the C-5 position.

とその 5 位の *N*-アセチル基が *N*-グリコリル基に置換された *N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) である (Figure 0-1)。Neu5Gc もやはり Neu5Ac を生合成前駆体としており、Neu5Ac から Neu5Gc への変換は、糖供与体である CMP (cytidine monophosphate) -シアル酸の段階で CMP-Neu5Ac 水酸化酵素 (CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase, Cmah) が電子伝達系のシトクロム *b*5 から電子を供与され、分子状の酸素を CMP-Neu5Ac に付加するモノオキシゲナーゼ反応により行われる(30, 31)。この反応は細胞質において行わ



**Figure 0-2 Biosynthesis of sialylated glycoproteins destined for the cell surface.**

The conversion of CMP-Neu5Ac to CMP-Neu5Gc is catalyzed by the enzyme CMP-Neu5Ac hydroxylase (Cmah). Cytosolic metabolism of sialic acid is responsible for the abundance of the molecular species of sialic acid on the cell surface, as a given ratio of cytosolic CMP-sialic acid is imported into the Golgi apparatus and then used by the sialyltransferases for the biosynthesis of glycoproteins *en route* to the plasma membrane. Black diamonds, sialic acids.

れ、各 CMP-シアル酸はシアル酸トランスポーターを介してゴルジ体へと運ばれ、そこでシアル酸転移酵素により糖鎖の末端に付加されて細胞表面へと移動する (Figure 0-2)。

本研究では、マウスの胚中心 B 細胞において、主なシアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へとダイナミックに変化することを明らかにした。胚中心は、T 細胞依存性抗原による免疫後に脾臓やリンパ節などの二次リンパ器官内に生じる組織構造であり、ラット由来モノクローナル抗体、GL7(39)とピーナッツ (*Arachis hypogaea*) レクチン、PNA(56)が胚中心を特異的に染色するマーカーとして広く用いられてきた。また、GL7 強陽性細胞は抗体産生能や抗原提示能が高く、GL7 エピトープの発現が B 細胞の機能と深く結びついている可能性が示唆されていた(7)。しかし、GL7 のエピトープに関しては、GL7 による抗原認識がシアリダーゼ感受性であるという報告があるが詳細な実験方法や結果は示されておらず(23)、シアル酸の関与が示唆されるものの、そのエピトープは同定されていなかった。筆者は、まず、シアル酸に注目して GL7 のエピトープの同定を行った。

第一章、第二章では、GL7 エピトープの同定について述べる。まず第一章では、ヒト B 細胞株を用いて GL7 エピトープの同定を行った。GL7 はもともとマウスの B 細胞上の抗原であるが、筆者は GL7 がヒト B 細胞株に結合することを見出し、ヒト B 細胞株を用いてエピトープの性質を調べ、GL7 がシアル酸を含む糖鎖と、シアル酸の結合様式依存的に結合することを明らかにした。次に第二章では、マウスの胚中心で GL7 エピトープが出現する機構について検討を行った。ヒトとマウスにおける主要シアル酸分子種の違いから、GL7 の結合がシアル酸分子種特異的であることを明らかにし、GL7 が  $\alpha 2-6$  結合の Neu5Ac を含む *N*-結合型糖鎖を認識する抗糖鎖抗体であることを明らかにした。また、B 細胞の活性化の場である胚中心において、*Cmah* の発現が抑制されることにより、主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へと大きく変化すること、そして GL7 が胚中心におけるこのシアル酸分子種の変化を検出する抗体であることを明らかにした。

さらに、第三章では、胚中心で Neu5Gc が減少する生理的意義を明らかにするため、Neu5Gc を欠失する *Cmah* ノックアウト (*Cmah*<sup>-/-</sup>) マウスの解析を行い、Neu5Gc を含む糖鎖が B 細胞の活性化に対し抑制的に働いていることを明らかにした。

以下、これらの結果について詳述する。

なお、本研究ではレクチン分子を糖鎖プローブとして使用しているが、それらの糖鎖認識における特異性は下の表に示すとおりである。

レクチン	糖鎖構造
<b>植物レクチン</b>	
SSA ( <i>Sambucus sieboldiana</i> agglutinin)	Neu5Ac/Neu5Gc $\alpha$ 2-6Gal/GalNAc
Con A (Concanavalin A; <i>Canavalia ensiformis</i> lectin)	$\alpha$ Man
WFA ( <i>Wisteria floribunda</i> agglutinin)	Terminal GalNAc
PNA ( <i>Arachis hypogaea</i> agglutinin)	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -Thr/Ser
<b>キメラタンパク質</b>	
mSn-Fc	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal
mCD22-Fc	Neu5Gc $\alpha$ 2-6Gal
hCD22-Fc	Neu5Ac/Neu5Gc $\alpha$ 2-6Gal

遺伝子名およびタンパク質名の表記については、GenBank の表記法に従い、下記のとおりとした。

ヒト 遺伝子：すべて大文字/イタリック体（例 *ST6GAL1*）

タンパク質：すべて大文字（例 ST6GAL1）

マウス 遺伝子：最初の文字のみ大文字、残りは小文字/イタリック体（例 *St6gal1*）

タンパク質：最初の文字のみ大文字、残りは小文字（例 St6gal1）

ラット 遺伝子名がヒトやマウスと大きく異なることがあるので、混乱を避けるため、本論文ではマウスの表記法に従った。

また、酵素名として表記する際は、必要に応じて慣用的な表記法を用いた。

## 略語

Sia, Sialic acid; Neu5Ac, *N*-acetylneuraminic acid; Neu5Gc, *N*-glycolylneuraminic acid; CMP, cytidine monophosphate; Cmah, CMP-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase; Gal, Galactose; Glc, Glucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; LacNAc, *N*-acetylglactosamine; Man, Mannose.

## 第一章 GL7 エピトープの同定

GL7 は、マウスの活性化 B 細胞を免疫原として作られたラット由来モノクローナル抗体であり(35)、*in vitro* で活性化させた B 細胞、T 細胞、そして胸腺の T 細胞の一部(23)を染めることが知られている。また、マウス B 細胞ではその分化段階に応じて GL7 エピトープの発現が変化することが明らかにされており、骨髄の大型プレ B 細胞の段階では GL7 エピトープを発現しているが、その後分化、成熟が進み IgD を発現するようになると GL7 エピトープを失う(7, 43)。そして、活性化すると再び GL7 エピトープを発現するようになる。

このように GL7 がどのような細胞集団を染めるかについてはかなり調べられているものの、そのエピトープについてはほとんど解明されていない。*In vitro* で活性化させた B 細胞を用いてタンパク質の代謝標識を行い GL7 による免疫沈降を行うと、35 kDa の膜タンパク質が沈降されてくることから、Laszlo らはこのタンパク質が GL7 の認識抗原である可能性を示唆している(35)。また、実験に関する詳細な記述はないものの、GL7 による染色がシアリダーゼ感受性であるという報告があるが(23)、これら以外にエピトープに関する報告はなく、GL7 のエピトープはいまだ同定されていなかった。

GL7 による染色がシアリダーゼ感受性であるということから、GL7 はシアル酸を含む分子を認識していると考えられる。糖鎖の末端に付加されるシアル酸は、生体内、外の様々な分子のリガンドとして働き、細胞間接着や細胞内・細胞間シグナル伝達を制御することが知られている(70)。さらに、GL7 強陽性細胞は高い抗体産生能や抗原提示能を有することから、GL7 エピトープの発現が B 細胞の機能と深く結びついている可能性が示唆されている(7)。したがって、GL7 により認識される分子を明らかにすることは、活性化 B 細胞のシグナル伝達や機能の解明につながることを期待される。そこで、筆者はシアル酸の存在に注目して GL7 エピトープの同定を行った。

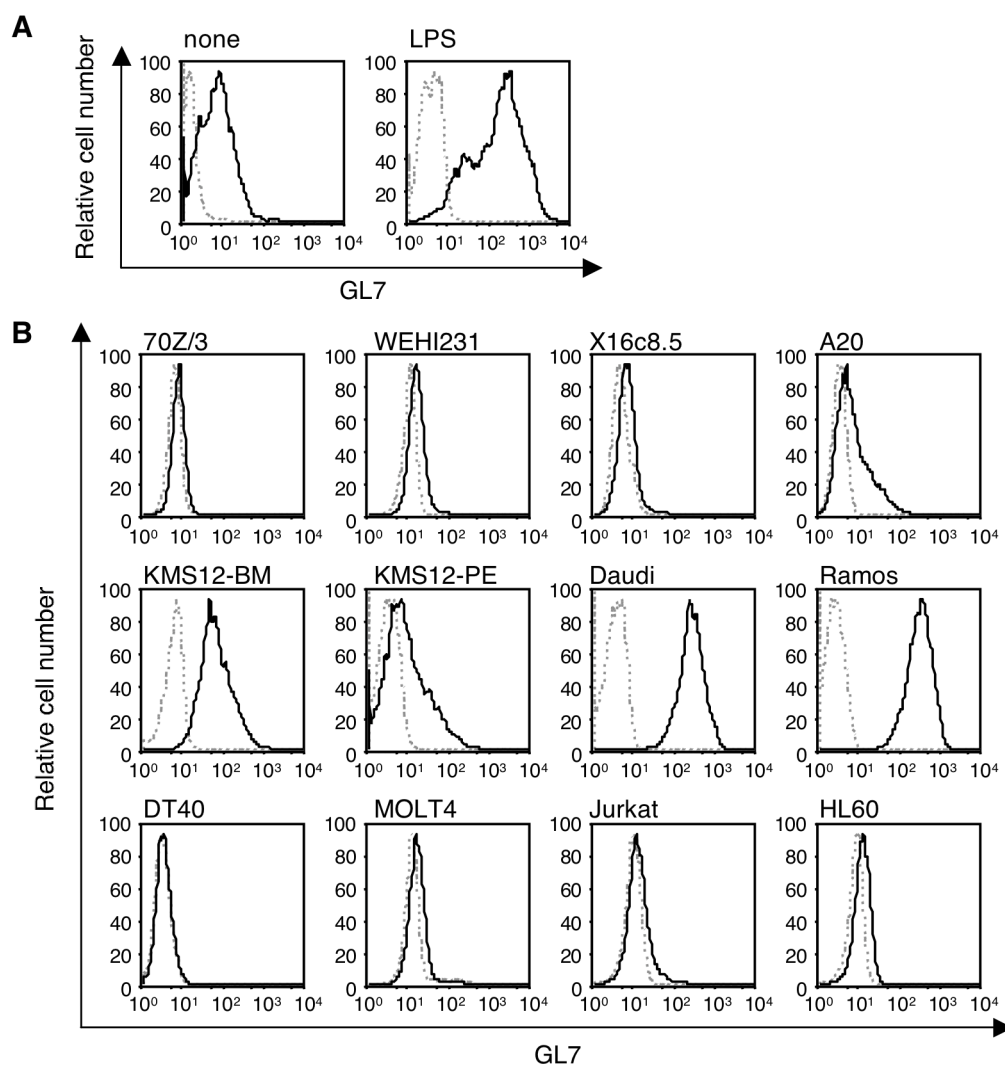
### 第一節 GL7 はヒト B 細胞株にも結合する

GL7 のエピトープを同定するため、まず様々な細胞におけるエピトープの発現をフローサイトメトリーにより調べた。マウスの脾臓 B 細胞は非活性化時には GL7 で染まらないが、リポ多糖 (LPS) で刺激すると GL7 陽性となる(35) (Figure 1-1A)。一方、マウス B 細胞株としてプレ B 細胞株 70Z/3、未成熟 B 細胞株 WEHI231、成熟 B 細胞株 X16c8.5 (IgM 陽性)、A20 (IgG 陽性) の染色を行ったが、これらの細胞株は分化段階に関わらず GL7 でほ



ほとんど染まらなかった (Figure 1-1B)。これに対し、ヒト B 細胞株 KMS-12 BM、KMS-12 PE、Daudi、Ramos はいずれも GL7 陽性であった。また、T 細胞株など他のヒト血球系細胞株の染色も行ったが、B 細胞株が最も強く染色された。

これらの結果から、GL7 のエピトープはマウスに特異的な分子ではないが、B 細胞に多く発現が見られる分子である可能性が示唆された。



**Figure 1-1 GL7 staining in flow cytometry.**

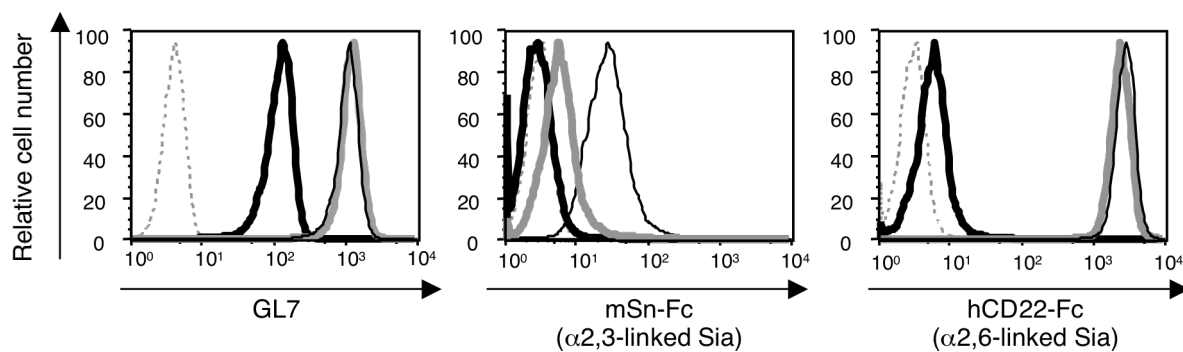
(A) Mouse splenic B cells were cultured with or without LPS (30 µg/ml) for 48 h and stained with FITC-conjugated GL7. Black bold lines indicate staining with GL7, and gray dashed lines indicate nonstaining controls (A and B).

(B) Mouse B-cell lines (70Z/3, WEHI23, X16c8.5, A20), human B-cell lines (KMS-12 BM, KMS-12 PE, Daudi, Ramos), a chicken B-cell line (DT40), human T-cell lines (MOLT4, Jurkat), and a human promyelocytic leukemia cell line (HL60) were stained with FITC-conjugated GL7.

## 第二節 GL7 のエпитープはシアル酸を含む *N*-結合型糖鎖である

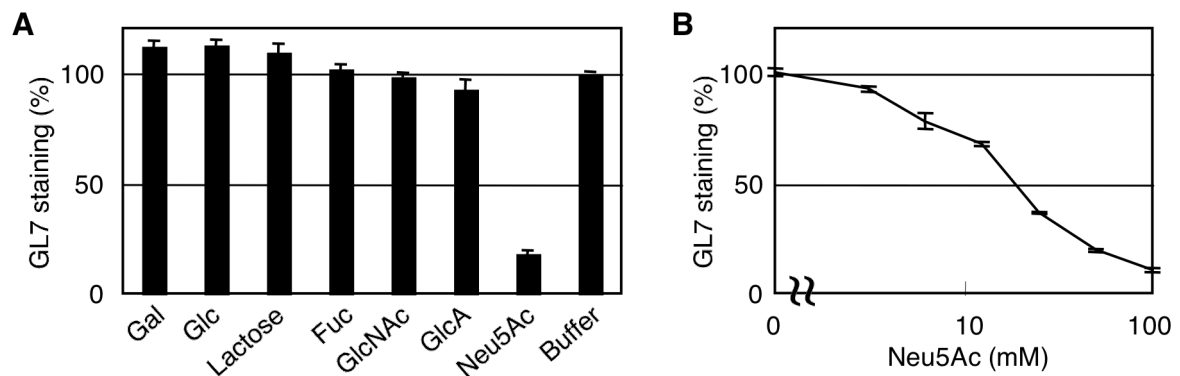
ヒト B 細胞株で発現している GL7 エピトープがマウスの活性化 B 細胞で発現する GL7 エピトープと同じものであれば、発現量の多いヒト B 細胞株を用いることで、エピトープの同定が容易になると考えられる。そこで、GL7 で強く染色されたヒト B 細胞株、Daudi 細胞を用いて GL7 の結合特性を調べることにした。

GL7 エピトープに関する数少ない情報の中に、GL7 による染色がシアリダーゼ感受性であるという報告がある(23)。シアリダーゼは、シアロ糖鎖からシアル酸を遊離させる酵素である。まず、Daudi 細胞上のエピトープへの GL7 の結合にシアル酸が関与しているか調べるため、Daudi 細胞を基質特異性の異なる 2 種類のシアリダーゼで処理し、その後 GL7 による染色を行った。また、シアリダーゼ処理のコントロールとして、 $\alpha$ 2-3 結合のシアル酸を特異的に検出するプローブ、mSn-Fc および  $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を特異的に検出するプローブ、hCD22-Fc による染色も行った(6)。その結果、 $\alpha$ 2-3, 6, 8 結合のシアル酸を外す *Arthrobacter ureafaciens* 由来シアリダーゼで処理した Daudi 細胞では、GL7 による染色が著しく低下した (Figure 1-2)。一方、 $\alpha$ 2-3 結合のシアル酸を特異的に外す *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 由来シアリダーゼを用いた場合は、GL7 による染色に変化が見られなかった。この結果から、GL7 が Daudi 細胞においてもシアル酸を含む分子を認識しており、さらにシアル酸とその還元末端側の糖との結合様式の違いも区別し、 $\alpha$ 2-6 もしくは  $\alpha$ 2-8 結合のシアル酸を認識することが示唆された。



**Figure 1-2 Effect of sialidase treatment on GL7 staining.**

Daudi cells were treated with sialidase before staining with FITC-conjugated GL7, mSn-Fc, or hCD22-Fc. Gray dashed lines indicate negative controls (nonstaining for GL7 and R-PE-conjugated anti-human IgG for the others), and black thin lines indicate staining results without sialidase treatment. Black bold lines indicate staining results with *Arthrobacter ureafaciens* sialidase treatment, and gray bold lines indicate staining results with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sialidase treatment. Sialidase from *A. ureafaciens* releases  $\alpha$ 2-3,6,8-linked Sia, whereas sialidase from *S. enterica* serovar Typhimurium is specific to the  $\alpha$ 2-3 linkage. To confirm the effect of sialidase treatment, changes in cell surface expression of  $\alpha$ 2,3-linked Sia and  $\alpha$ 2,6-linked Sia were detected with mSn-Fc and hCD22-Fc chimeric probes precomplexed with R-PE-conjugated anti-human IgG, respectively. Sia, sialic acid.

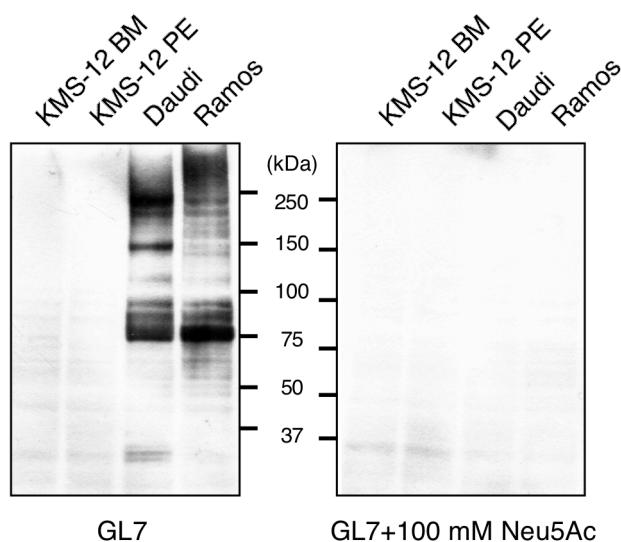


**Figure 1-3 Effect of free sugars on GL7 binding.**

Daudi cells were stained with FITC-conjugated GL7 in the presence of 50 mM free sugars (A) or the indicated concentrations of Neu5Ac (B). The data are shown as the relative mean fluorescence intensity of each staining and the bars represent standard errors of the means. Gal, galactose; Glc, glucose; Fuc, fucose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; GlcA, glucuronic acid.

そこで、GL7 の結合がシアル酸依存的であるかさらに詳しく調べるため、シアル酸およびその他の単糖による GL7 結合阻害実験を行った。GL7 による染色時に各単糖を加え、フローサイトメトリーで GL7 の結合を調べたところ、ヒトにおける主要シアル酸分子種である Neu5Ac が特異的な結合阻害を示した (Figure1-3A)。また、Neu5Ac による GL7 の結合阻害は Neu5Ac の濃度依存的であった (Figure1-3B)。

GL7 がシアル酸を含む糖鎖を認識していることが示唆されたので、次にウエスタンブロッティングを行い、GL7 のエピトープとされている 35 kDa のタンパク質が検出されるか調べた。denature された分子上の糖鎖をメンブレン上で検出することは困難なことが多いが、GL7 を用いたウエスタンブロッティングでは、様々な分子量をもつ数多くのバンドが検出された (Figure1-4)。これらのバンドは GL7 との反応時に Neu5Ac を添加することにより消

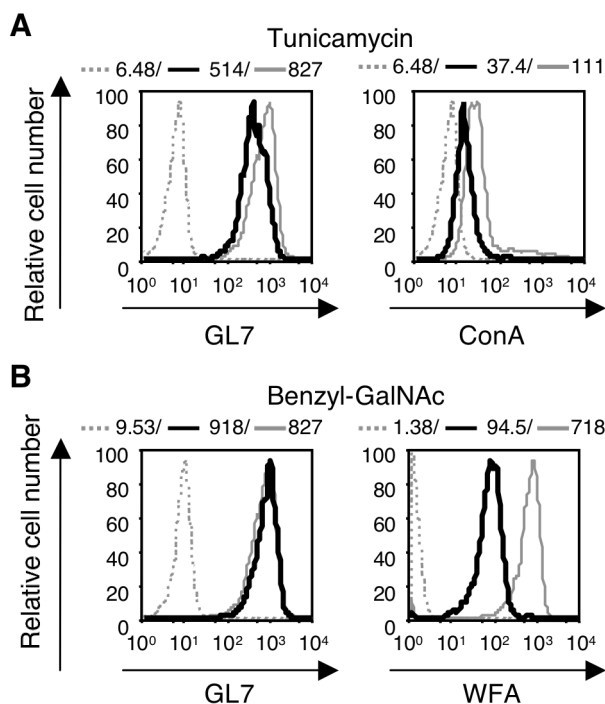


**Figure 1-4 GL7 blotting on human B-cell lines.**

Membrane fractions of human B-cell lines were analyzed by GL7 immunoblotting. The addition of 100 mM Neu5Ac during incubation with GL7 reduced most of the staining on blotted membranes.

失したことから、全てシアル酸を介した結合であると考えられ、この結果から、GL7がある特定のタンパク質を認識しているのではなく、様々なタンパク質上に発現しているシアロ糖鎖を認識している可能性が示された。

タンパク質上に糖鎖が結合する様式には大きく分けて2種類ある。Asn-X-Ser/Thr配列中のAsnのNH<sub>2</sub>基にGlcNAcを還元末端とする糖鎖が結合するN-結合型糖鎖と、SerまたはThrにGalNAcが結合して作られるO-結合型糖鎖である。GL7が認識する糖鎖がどちらのタイプの糖鎖であるか明らかにするため、それぞれの糖鎖の生合成を阻害したDaudi細胞に対するGL7の結合を調べた。N-結合型糖鎖による糖タンパク質の修飾は、脂質であるドリコールに単糖が14個付加されて形成された糖結合ドリコール中間体（脂質中間体）が一つの塊としてAsnに転移されることから始まり、続くER内でのプロセッシングへと進んでいく。tunicamycinは、糖結合ドリコール中間体形成の第一段階であるドリコールピロリン酸N-アセチルグルコサミン形成過程を阻害するため、N-結合型糖鎖の合成を阻害する。また、benzyl-GalNAcは、pp-GalNAcトランスフェラーゼによるSer/ThrへのGalNAcの転移を阻害することにより、O-結合型糖鎖の生合成を阻害する。Daudi細胞にtunicamycinまたはbenzyl-GalNAcを加えて24時間処理したあと、GL7で染色し、フローサイトメトリーを行った。また、tunicamycin、benzyl-GalNAcともに細胞毒性を示すことから弱い条件で処理を行っているので、それぞれの処理による糖鎖の生合成阻害を確認するため、Concanavalin A (Con A) およびWFAレクチンによる染色も併せて行った。Con Aはマンノースを2残基以上含む構造に対し親和性を示し、高マンノース型、混成型、2本鎖複合



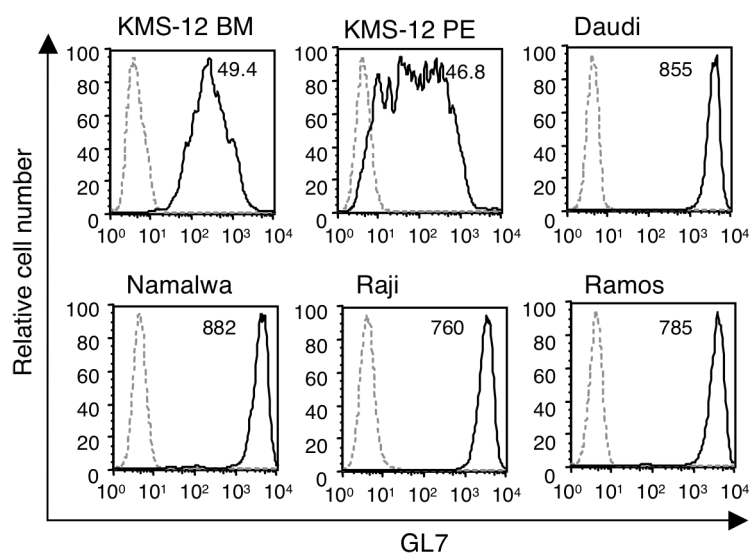
**Figure 1-5 Decrease in GL7 epitope expression by metabolic inhibition of N-glycan biosynthesis.**

Daudi cells were treated with tunicamycin (10 µg/ml) or benzyl-GalNAc (5 mM) for 24 h and stained with FITC-conjugated GL7. Tunicamycin is a metabolic inhibitor of N-glycan biosynthesis, and benzyl-GalNAc is a metabolic inhibitor of O-glycan. Staining with ConA or WFA lectin was used as a control for metabolic inhibition. Solid lines indicate the results of GL7 or lectin staining with (black) or without (gray) metabolic inhibitor treatment, and gray dashed lines indicate nonstaining controls (for GL7 and ConA) or control staining with FITC-conjugated streptavidin (for WFA). Mean fluorescence intensity of each staining is indicated at the top of each panel.

型の *N*-結合型糖鎖に結合する。一方、WFA は糖鎖の末端に存在する GalNAc を認識するので、*O*-結合型糖鎖を検出することができる。フローサイトメトリーの結果、*O*-結合型糖鎖生合成阻害剤である benzyl-GalNAc で処理した細胞では、コントロールである WFA による染色は低下したが、GL7 による染色には非処理の細胞と比較して変化が見られなかった (Figure 1-5)。これに対し、tunicamycin により *N*-結合型糖鎖の生合成を阻害剤すると GL7 の結合が減少したことから、GL7 は *N*-結合型糖鎖上のシアル酸を認識していると考えられた。

### 第三節 GL7 は $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む糖鎖を認識する

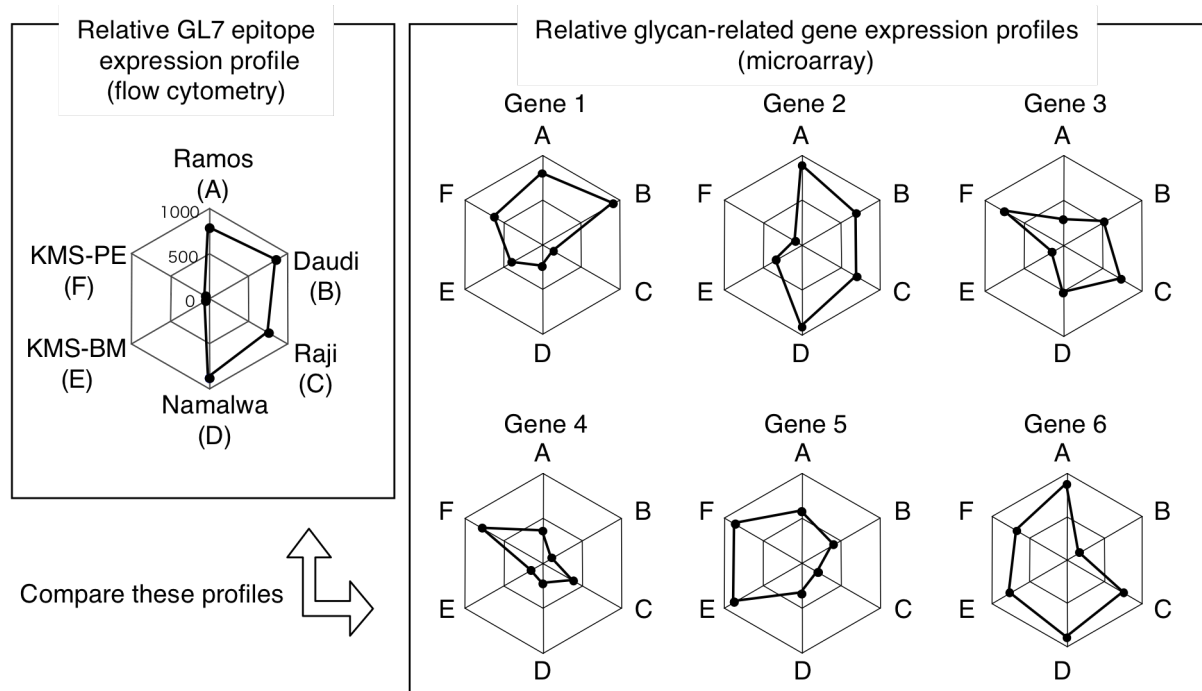
第一節でも示したとおり、ヒト B 細胞株は GL7 陽性であるが、その結合の程度は細胞株によって異なる (Figure 1-6)。GL7 エピトープにはシアル酸が含まれることが明らかになり、また、GL7 によるウエスタンブロッティングで分子量の異なる多くのバンドが検出されたことから、GL7 が特定のタンパク質というよりも糖鎖のみを認識している可能性が示唆された。このことから、各細胞株で GL7 の結合の強さを決めているのは、GL7 に認識される糖鎖が付加されるタンパク質の発現量ではなく、GL7 の認識する糖鎖の発現量、つまり糖鎖の生合成に関わる酵素の活性であると考えられた。糖鎖の生合成に関わる酵素は、リン酸化などの翻訳後修飾ではなく、酵素の発現量そのものによってその活性の調節がなされていることが知られている。実際、シアル酸転移酵素遺伝子の発現と細胞表面糖鎖へのレクチンの結合に相関があるという報告もある(5)。そこで、Figure 1-6 に示した 6 種類のヒト B 細胞株間で、



**Figure 1-6 Numerical comparison of GL7 staining among human B-cell lines.**

The results of GL7 staining of human B-cell lines were numerically compared using mean fluorescence intensity (MFI) values in flow cytometry. To normalize the binding in different cells, the endogenous fluorescence (background) of sample cells (gray dashed lines) was adjusted to MFI of around 5. For comparison with the gene expression profile, GL7-stained MFI values were divided by the background values. The relative values indicated on the top of each staining were used as the GL7 determinant expression profile.





**Figure 1-7 Concept of the cross-sample comparison between GL7 epitope expression profile and glycan-related gene expression profiles.**

The relative mean fluorescence intensity of GL7 staining in flow cytometry (Figure 1-6) was obtained to create cross-sample GL7 epitope expression profile. This profile (left panel) was compared with the cross-sample relative gene expression profiles obtained from microarray (right panel) by calculating the Pearson's correlation coefficients.

GL7 エピトープの発現量と糖鎖関連遺伝子の発現量とを比較し、GL7 エピトープの生合成に関わる糖転移酵素遺伝子を同定することにより、エピトープとなる糖鎖の構造を推定することを試みた。

まず、フローサイトメトリーの結果から、GL7 で染色を行ったサンプルの平均蛍光強度を非染色（ネガティブコントロール）サンプルの平均蛍光強度で割ることにより、GL7 エピトープの発現量を数値化した（Figure 1-6）。この GL7 エピトープの発現量を、発現が強いほど外側に位置するように六角形のグラフにプロットすると、これら 6 つの B 細胞株における GL7 エピトープの発現の相対的な強さを、一つの図形、つまり「パターン」としてとらえることができる（Figure 1-7）。次に、cDNA マイクロアレイを用い、フローサイトメトリーに用いたのと同じ組み合わせの B 細胞株における遺伝子の発現量を求めた。6 細胞間での遺伝子の発現量を比較するため、これらの細胞から得た RNA と様々な臓器由来の RNA の混合物である「universal reference RNA」(47)とで競合ハイブリダイゼーションを行い、各細胞の RNA サンプルの値を「universal reference RNA」の値で割ることにより、「universal reference RNA」に対する相対値として遺伝子の発現量を算出した。cDNA マイクロアレイは、我々の研究室で新たに作製した、糖鎖関連遺伝子 888 個を中心に約 1100 個の遺伝子を

のせた cDNA マイクロアレイを用いた。このようにして得られた各遺伝子の相対的発現量を、GL7 エピトープの発現量と同様に六角形のグラフ上にプロットすると、遺伝子ごとの発現パターンとして表すことができる (Figure 1-7)。それらの遺伝子の発現パターンのうち、GL7 エピトープの発現パターンにより近い (=形が似ている) もの、つまり相関が高いものがエピトープの生合成に大きく寄与する遺伝子である可能性が高い、と考えられた。実際の発現パターンの比較方法としては、統計の分野で一般的に用いられているピアソンの相関係数を算出するという方法を用いた。相関係数は 1 から -1 の範囲で表され、両者が完全に相関すれば 1、全く相関がなければ 0、そして逆相関を示せば -1 となる。

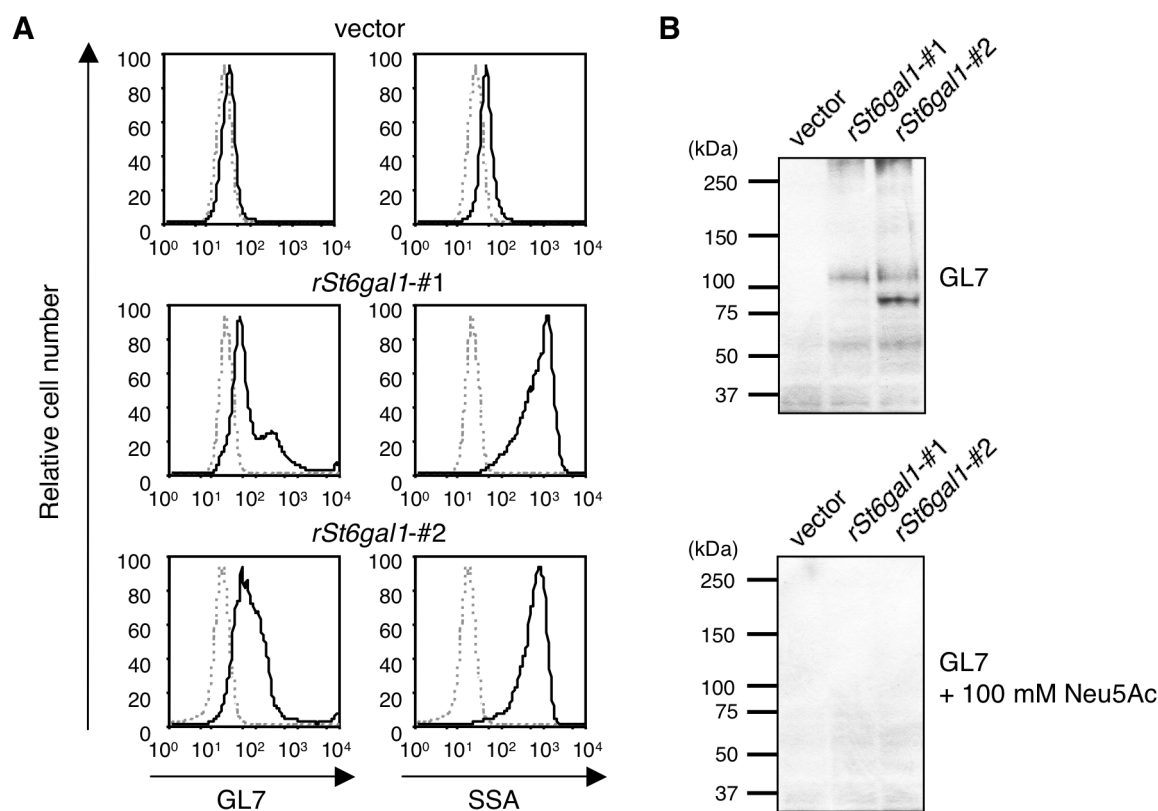
**Table 1. Pearson's correlation index analysis of Sialic acid (Sia)-related genes<sup>a</sup>**

Index	P value	Gene name	Encoded enzyme
0.937	5.87E-03	<i>ST6GAL1</i>	ST6Gal I
0.806	5.30E-02	<i>ST3GAL3</i>	ST3Gal III
0.551	2.57E-01	<i>CMAH</i>	Pseudogene for CMP-Neu5Ac hydroxylase
0.473	3.44E-01	<i>ST3GAL2</i>	ST3Gal II
0.215	6.82E-01	<i>SLC35A1</i>	CMP-Sia transporter
0.173	7.43E-01	<i>ST8SIA1</i>	ST8Sia I
0.142	7.89E-01	<i>ST3GAL6</i>	ST3Gal VI
0.137	7.96E-01	<i>PGM3</i>	GlcNAc-6-P mutase
0.096	8.56E-01	<i>GMPPB</i>	GDP-Man pyrophosphorylase
0.052	9.22E-01	<i>ST6GALNAC2</i>	ST6GalNAc II
-0.103	8.47E-01	<i>ST8SIA3</i>	ST8Sia III
-0.196	7.10E-01	<i>ST8SIA4</i>	ST8Sia IV / PST
-0.210	6.89E-01	<i>GNE</i>	UDP-GlcNAc-2-epimerase/ManNAc kinase
-0.283	5.87E-01	<i>ST6GALNAC6</i>	ST6GalNAc VI
-0.442	3.80E-01	<i>ST3GAL5</i>	ST3Gal V
-0.448	3.72E-01	<i>ST6GALNAC1</i>	ST6GalNAc I
-0.452	3.68E-01	<i>ST8SIA5</i>	ST8Sia V
-0.508	3.04E-01	<i>SAS</i>	Neu5Ac-9-P synthase
-0.639	1.72E-01	<i>ST6GALNAC4</i>	ST6GalNAc IV
-0.678	1.39E-01	<i>NEU3</i>	Membrane sialidase
-0.696	1.25E-01	<i>NEU1</i>	Lysosomal sialidase
-0.739	9.30E-02	<i>ST8SIA2</i>	ST8Sia II / STX
-0.742	9.12E-02	<i>ST3GAL4</i>	ST3Gal IV
-0.898	1.52E-02	<i>ST3GAL1</i>	ST3Gal I
-0.938	5.62E-03	<i>SIAE</i>	Sia-9-O-acetylsterase

<sup>a</sup> Pearson's correlation coefficient (index) values of relative gene expression in the microarray against relative GL7 staining mean fluorescence intensity among six B -cell lines were calculated for sialyltransferase genes and Sia metabolism-related genes. A positive value indicates the presence of a correlation between gene expression and staining. A negative value indicates the presence of a negative correlation. Index values are also expressed as *P* values.

GL7 がシアル酸を含む分子をエピトープとして認識すると考えられることから、シアル酸転移酵素およびシアル酸の代謝に関わる酵素に関して相関係数を算出したところ、*ST6GAL1* の発現が非常に高い相関を示した (Table1)。*ST6Gal I* はシアル酸を $\alpha$ 2-6 結合で LacNAc (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) に付加するシアル酸転移酵素である。この相関係数の結果から、これらのヒト B 細胞株において GL7 エピトープの発現量を決めているのは、糖転移酵素の基質となる糖供与体の生合成反応ではなく、糖鎖生合成の最終段階である末端のシアル酸転移反応に関わる酵素、*ST6GAL1* の発現量であることが示唆された。つまり、*ST6GAL1* によるシアル酸の付加が GL7 エピトープの合成の律速反応であり、この反応により生合成される $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を GL7 が認識する可能性が示唆された。

この相関係数の計算から導かれた可能性を検証するため、 $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸の発現を欠いている CHO-K1 細胞(36)にラット由来 *St6gal1* (*rSt6gal1*) を強制発現させ、GL7 陽性となるか調べた。空ベクターをトランスフェクトした細胞は、予想通り親株と同様 GL7 陰性



**Figure 1-8 Appearance of the GL7 determinant by *St6gal1* expression.**

(A) CHO-K1 clones stably transfected with rat *St6gal1* or an empty vector (as a control) were stained with FITC-conjugated GL7 or FITC-conjugated SSA (black solid lines). Results from two such clones are shown. Gray dashed lines indicate nonstaining controls.

(B) Membrane fractions of CHO-K1 clones stably transfected with rat *St6gal1* or an empty vector were subjected to GL7 immunoblotting.

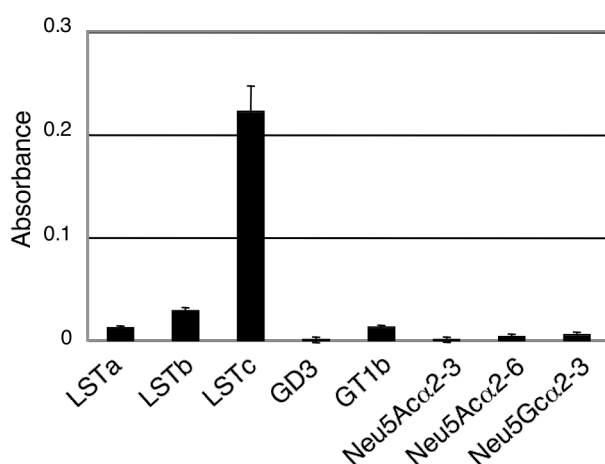


であり、Sia $\alpha$ 2-6Gal/GalNAc を認識する植物レクチン SSA (*Sambucus sieboldiana* agglutinin) でも染まらなかった (Figure 1-8A)。一方、*rSt6gal1* を発現させた細胞は、SSA による染色の増加に伴い、GL7 で染まるようになった。また、ヒト B 細胞株と同様に、GL7 を用いたウエスタンブロッティングにより複数のバンドが検出された (Figure 1-8B)。*rSt6gal1* を発現させることにより、CHO-K1 細胞のような非免疫系由来の細胞も GL7 陽性となったことから、GL7 は様々な細胞に広く発現しているタンパク質上の $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を有する糖鎖を認識していると考えられた。

#### 第四節 GL7 は Sia $\alpha$ 2-6LacNAc を認識する

GL7 が $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む糖鎖を認識する抗糖鎖抗体であることを確認するとともに、GL7 の認識する糖鎖構造をさらに詳しく決定するため、ELISA 法により GL7 と種々の糖鎖プローブとの結合を調べた。GL7 を固相化したプレートに、シアル酸を含む各種糖鎖プローブを加えてその結合を測定したところ、 $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む LSTc (Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) のみが GL7 と結合し、LSTc の構造異性体であり $\alpha$ 2-3 結合のシアル酸を含む LSTa (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) は結合しなかった (Figure 1-9)。また、興味深いことに、Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc (シアリルラクトース) は、 $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を有するにも関わらず、GL7 と結合しなかった。各糖鎖プローブの還元末端のグルコースは、プローブの作製時にストレプトアビジンとの結合のため開環しているため、GL7 は三糖以上の糖鎖を認識しているか、LacNAc (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の GlcNAc を含めた構造を認識していると思われる。

以上の結果より、GL7 は N-結合型糖鎖上の Sia $\alpha$ 2-6LacNAc をエпитープとして認識し



**Figure 1-9 Carbohydrate binding assay of GL7.**

Carbohydrate binding was measured using ELISA. Data are shown as the means of triplicate samples, and the bars represent standard errors of the mean. LSTa, Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc; LSTb, Gal $\beta$ 1-3(Neu5Ac $\alpha$ 2-6)GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc; LSTc, Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc; GD3, Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc; GT1b, Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4(Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-4Glc; Neu5Ac $\alpha$ 2-3, Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc; Neu5Ac $\alpha$ 2-6, Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc; Neu5Gc $\alpha$ 2-3, Neu5Gc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc.

ていることが明らかになった。

## 第五節 考察と総括

本章では、マウス活性化 B 細胞のマーカーである GL7 のエピトープが、 $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む N-結合型糖鎖であることを明らかにした。

第一節では、マウス以外の哺乳動物細胞の B 細胞株も含めた様々な細胞株を GL7 で染色することにより、ヒト B 細胞株が GL7 で強く染色されることを見出した。これまで GL7 はマウスの特定の分化段階、または活性化状態の B および T 細胞を染める抗体としてしか用いられていなかったが、ヒト B 細胞株が GL7 陽性であることが明らかになったことで、GL7 のエピトープの同定を優位に進めることができた。

第二～四節では、様々な実験手法を用いて多角的に GL7 の結合特性を調べることで、GL7 エピトープの同定を行った。Hathcock らの論文に GL7 の結合がシアリダーゼ感受性であるという記述があったことから、GL7 がシアル酸を含む分子を認識している可能性が示唆されていたが、実際の結果や実験に用いたシアリダーゼの種類が記述されていないなど、詳細は不明であった。そこで、第二節では基質特異性の異なる 2 種類のシアリダーゼによる処理や、各種単糖の添加が GL7 の結合に与える影響を調べ、GL7 によるエピトープの認識にはシアル酸が非常に重要であることを明らかにした。さらに *in vitro* で糖鎖プローブとの結合を測定し、GL7 のエピトープが N-結合型糖鎖上の Sia $\alpha$ 2-6LacNAc という構造であることを明らかにした。また、GL7 プロットで複数のタンパク質が検出されたこと、そして ELISA を用いた糖鎖プローブとの結合実験で GL7 が糖鎖のみと結合したことから、GL7 がある特定の糖鎖修飾タンパク質を抗原として認識するのではなく、糖鎖のみをエピトープとして認識しており、様々なタンパク質と結合する可能性を持つことが明らかとなった。

本章では、GL7 エピトープの同定のため、糖鎖の生合成に関わる酵素の発現とその産物である糖鎖の発現を比較し、目的の糖鎖の生合成に寄与している酵素遺伝子を同定することで、糖鎖の構造を推測するという革新的な方法を用いた。また、この比較のため、マイクロアレイで得られた遺伝子の発現の強弱および、抗糖鎖抗体による染色の強さ、つまり最終産物である糖鎖の発現の強弱を数値化したものを、「パターン」としてとらえた。さらに、通常マイクロアレイは異なる 2 種類の細胞間での遺伝子の発現の違いを比較するために用いられるが、筆者は様々な臓器由来の RNA を混合した「Universal Reference RNA」を用いることにより、多サンプル間での比較を行った。複数の細胞における遺伝子の発現と、それらの遺伝子由来の産物の発現を「パターン」としてとらえて比較し、最終産物の発現量に最も寄与して

いる酵素を見つけ出そうというこの方法は、酵素遺伝子の発現量とその酵素反応による産物の量が比例し、かつ少数の酵素が律速酵素として働いている場合には非常に有効な方法であると考えられる。糖転移酵素が触媒する反応は、リン酸化などの修飾ではなく酵素の発現量により制御が行われているため、この方法が有用であると考えられた。実際、フローサイトメトリーで得られた GL7 エピトープの発現量とマイクロアレイから得られたシアル酸関連酵素遺伝子の発現量の比較により、GL7 のエピトープとなる糖鎖の生合成に関わる酵素の候補として ST6GAL1 が得られた。そして、その後の検証実験により、GL7 のエピトープが ST6GAL1 の産物である $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む糖鎖であることが確認された。この方法の最大の利点の一つとして、マイクロアレイを一度行えば、各遺伝子の発現量の相対値をデータとして保存しておき繰り返し利用できる点が挙げられる。つまり、あとは興味のある事象（ここでは糖鎖の発現）を数値化したものさえ用意すれば、すぐに相関を計算することができる。この方法はあくまでもスクリーニングであり、高い相関係数が得られたものが必ずしもその事象に寄与しているとは限らず、その後様々な検証実験を行う必要がある。しかし、一度に多数の遺伝子を解析できること、そして網羅的に解析するため想定していなかった遺伝子の関連も見つけ出すことが可能であることなど、利点は非常に多く、今後、糖鎖に限らず様々な分野に応用されることが期待される。

## 第六節 実験方法

### 試薬、細胞

ほとんどの試薬類は Wako Chemical (Japan) および Nacalai Tesque (Japan) から購入した。

各種細胞株は、American Type Culture Collection および Japanese Collection of Research Bioresources より購入した。

### 抗体およびレクチン

FITC-conjugated GL7 および purified GL7 は BD PharMingen (USA) から、FITC-conjugated streptavidin は CALTAG Laboratories (USA) から、HRP-conjugated goat anti-rat IgM は Southern Biotechnology Associates (USA) から購入した。FITC-conjugated Concanavalin A (Con A)、FITC-conjugated *Sambucus sieboldiana* agglutinin (SSA) は生化学工業 (Japan) より購入した。Biotinylated *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) は Sigma (USA) より購入した。

### sialoadhesin-Fc および CD22-Fc プローブの作製

マウス sialoadhesin (Sn)/Siglec-1、マウス CD22/Siglec-2 およびヒト CD22/Siglec-2 の N 末ドメイン 1~3 (リガンド結合部位) にヒト IgG1 の Fc 領域を結合させたキメラタンパク質、mSn-Fc、mCD22-Fc、hCD22-Fc の発現コンストラクトを作製し、シアル酸を付加することができない変異細胞株である Lec2 細胞にトランスフェクトして、それぞれの安定発現細胞株を得た。mSn-Fc の安定発現細胞株は OPTI-MEM (Invitrogen, USA) で、その他の安定発現細胞株は CHO 細胞用無血清培地、CHO-S-SFM II (Invitrogen) で培養し、これらの培養上清から Protein A-Sepharose column (Pierce, USA) を用いて各キメラタンパク質を精製した。

ヒト IgG1-Fc コンストラクトはダンディー大学の Paul Crocker 博士、カリフォルニア大学サンディエゴ校の Ajit Varki 博士より恵与された。また、Lec2 細胞はアルバートアインシュタイン大学の Pamela Stanley 博士より恵与された。

### フローサイトメトリー

細胞の染色は FACS buffer (1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> in phosphate-buffered saline [PBS]) 中に行った。染色した細胞は、PBS で洗浄後 FACS buffer もしくは Fix buffer (1% formaldehyde in PBS) に再懸濁させ、FACScan (Becton Dickinson, USA) を用いて蛍光強度を測定した。得られたデータの解析には、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, USA) を用いた。

mSn-Fc、hCD22-Fc による染色では、あらかじめこれらの Fc 融合プローブと R-PE 標識された抗ヒト IgG 抗体を 4℃ でインキュベートすることにより複合体を形成させておき、この複合体を染色に用いた。

マイクロアレイとの比較用のデータの採取は、以下のように行った。染色条件は、最も強く染色されるサンプルにおいても抗体 (GL7) の結合が飽和しないように検討し、 $1 \times 10^5$  個の B 細胞株を、100 倍希釈した FITC 標識 GL7 で室温にて 1 時間染色した。染色時に抗体を加えていないコントロール細胞の FL-1 シグナルの値が 5 付近になるように FACScan のパラメーターを設定して、これらのサンプルのデータを取り込み、得られた各サンプルの FL-1 シグナルの平均値をコントロール細胞の FL-1 シグナルの平均値で割り、この値を各細胞株における GL7 エピトープの相対的発現量とした。

### シアリダーゼ処理

Daudi 細胞を 100 mM sodium acetate (pH 5.2) に懸濁し、*Arthrobacter ureafaciens* (Calbiochem, USA) または *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Takara, Japan)

由来のシアリダーゼを加えて、室温で 30 分間処理を行った。その後 FACS buffer（前述）で洗浄し、前述の方法に従って、細胞染色およびフローサイトメトリーを行った。

#### 糖鎖生合成阻害

Daudi 細胞に tunicamycin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) または benzyl-GalNAc (5 mM) を加えて 24 時間培養し、前述の方法に従い、細胞染色およびフローサイトメトリーを行った。

#### GL7 によるウエスタンブロットティング

細胞を detergent-free lysis buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1 mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque, Japan]) に溶解させ、超遠心 (約 142,000  $\times g$ , 30 分, 4°C) を行い、ペレットを膜画分として回収した。得られた膜画分を NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 25 mM HEPES [pH 7.4], protease inhibitor cocktail) に溶解させたものをサンプルとして SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写後、GL7 を一次抗体として用いてウエスタンブロットティングを行った。バンド検出の基質には化学発光基質である SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, USA) を用い、X 線フィルムに感光させてシグナルを検出した。

#### 糖鎖関連遺伝子 cDNA マイクロアレイの作製

「RIKEN frontier Human Glyco-gene cDNA Microarray」は、糖転移酵素遺伝子および糖代謝、糖鎖修飾、糖鎖認識、脂質代謝に関わる遺伝子 888 個をのせた cDNA マイクロアレイであり、タカラバイオに依頼して作製した。マイクロアレイの結果については、GEO platform (GPL3465) および GEO series (GSE4407) として Gene Expression Omnibus database に登録した。

#### cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析およびフローサイトメトリーの結果との相関係数の計算

Poly(A)<sup>+</sup> RNA の調製は mTRAP system (Activemotif, USA) を用いて行い、バイオアナライザー 2100 (Agilent Technologies, USA) でクオリティーチェックを行った。リボソーム RNA の混入分を差し引いた B 細胞株由来 poly(A)<sup>+</sup> RNA 1  $\mu\text{g}$  と universal reference RNA (Clontech, USA) 1  $\mu\text{g}$  を CyScribe first-strand cDNA labeling kit (Amersham, UK) を用いてラベルし、マイクロアレイ上で競合ハイブリダイゼーションを行った。細胞間の比較を公平に行うため、universal reference RNA のラベルは Cy3 に、B 細胞株由来 RNA のラベルは Cy5 に固定した。マイクロアレイの結果は、Affymetrix 428 array scanner を

用いて検出し、Edward 法によるバックグラウンド補正後、Linear Models for Microarray Data に従い、Lowess ノーマライズを行った(16)。そして、B 細胞株のデータである Cy5 のシグナルを、universal reference RNA のデータである Cy3 のシグナルで割り、6 種類の B 細胞株における各遺伝子の発現を universal reference RNA に対する相対値として算出した。この遺伝子発現の相対強度とフローサイトメトリーにより得られた GL7 染色の相対強度とを比較し、相関係数 (Pearson's correlation coefficient)、および *P* 値 (probability value) を計算した。6 サンプルの場合、相関係数が 0.81 を超えると 5% 優位となる。

### *St6gal1* の強制発現

ラット *St6Gal1* の cDNA を pIRES ベクター (Clontech, USA) に組み込み、Lipofectamine (Invitrogen, USA) を用いて CHO-K1 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を G418 (1 mg/ml) で選択し、複数クローンの安定発現株を得た。

ラット *St6Gal1* cDNA は理化学研究所の北爪しのぶ博士より恵与された。

### ELISA

100 mM sodium-carbonate buffer (pH 9) に希釈した抗ラット IgM 抗体で 96 穴プレート をコートし、blocking buffer (1% BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS) による処理後、GL7 抗体を加えて 4°C で一晩インキュベートし、GL7 をプレートに固相化した。これにストレプトアビジン標識した各糖鎖プローブ (50 μM) を反応させ、さらにビオチン標識したアルカリフォスファターゼ (Vector Laboratories, USA) を加えてインキュベートした。よく洗浄を行った後、アルカリフォスファターゼの基質として *p*-nitrophenyl phosphate を加え、405 nm の吸光度を 1420 ARVO luminometer (Wallac, Finland) で測定することにより、糖鎖プローブの結合を検出した。

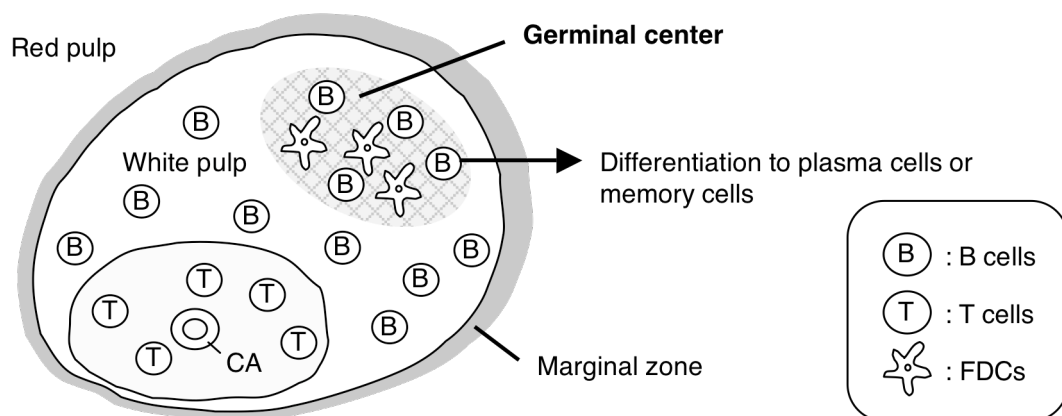
ストレプトアビジン標識糖鎖プローブは、理化学研究所の山地俊之博士、橋本康弘博士より恵与された。

## 第二章 胚中心 B 細胞におけるシアル酸分子種の変化

GL7 は、活性化 B 細胞マーカーとしてフローサイトメトリーなどで用いられるばかりでなく、免疫組織染色において、マウスの胚中心を染めるマーカーとしてもよく使われている(7, 39)。

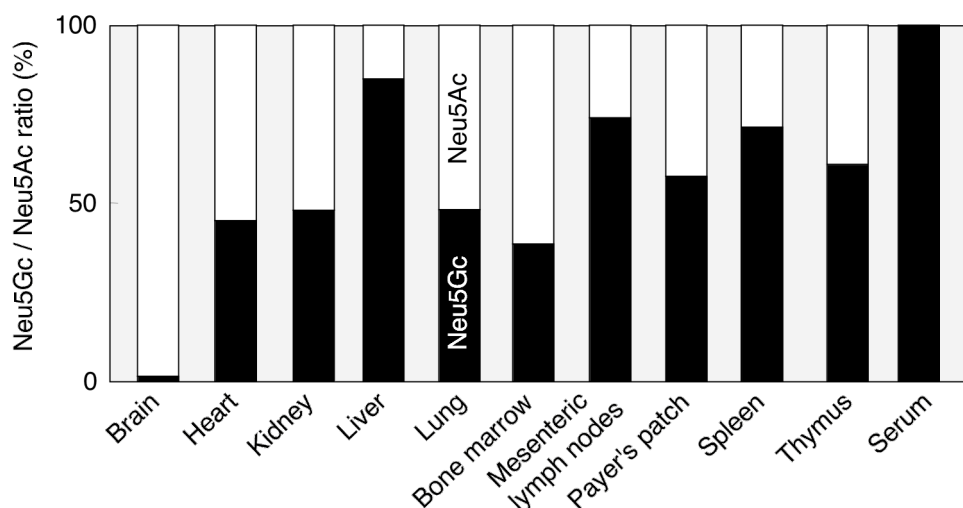
胚中心は、T 細胞依存性抗原による免疫後に、脾臓などの二次リンパ器官内に形成される組織構造である。B 細胞は、非活性化時には濾胞とよばれる領域に存在するが、抗原に反応すると T 細胞領域（脾臓では periarteriolar lymphoid sheath [PALS]）に移動する（Figure 2-1）。そこで同一抗原により活性化した T 細胞と出会うと、B 細胞は活性化されて活発に増殖し、抗体産生細胞へと分化する。この B 細胞の増殖・分化が起こるのが PALS と胚中心である。PALS で増殖した B 細胞が主に短寿命抗体産生細胞へと分化するのに対し、胚中心で増殖した B 細胞は長寿命抗体産生細胞や記憶 B 細胞へと分化する。さらに胚中心 B 細胞では、活発な細胞分裂に伴い、抗体のクラススイッチが起こるとともに、抗体（イムノグロブリン）遺伝子に多数の体細胞突然変異が生じ抗体の親和性上昇が起こる。つまり、胚中心は B 細胞活性化の場と言える。

第一章で、マウスの活性化 B 細胞マーカーである GL7 が Sia $\alpha$ 2-6LacNAc という糖鎖構造を認識すること、そしてヒト B 細胞株では非活性化時においても GL7 エピトープを発現しており、この GL7 エピトープの発現量を決めているのは Sia $\alpha$ 2-6 結合を作る ST6GAL1 の発現量であることを明らかにした。しかし、マウスの B 細胞は非活性化状態においても St6gal1



**Figure 2-1. Schematic organization of follicle in spleen.**

The spleen consists of red pulp and white pulp. White pulp is composed of B-cell area and T-cell area, and is surrounded by the marginal zone. T cells are found around the central arteriole (CA). Germinal centers arise in secondary lymphoid organs primarily upon immunization with T-dependent antigens. The germinal center, formed at sites where follicular dendritic cells (FDCs) are present, is the microenvironment for B cell maturation, somatic hypermutation and class switching.



**Figure 2-2 Expression of Neu5Gc in various tissues of mice.**

Acid-hydrolyzed sialic acid from the indicated tissues was derivatized using DMB, and the ratios of Neu5Ac and Neu5Gc to total sialic acid (Neu5Ac+Neu5Gc) were measured by reverse-phase HPLC. Solid columns represent the percentage of Neu5Gc and open columns represent the percentage of Neu5Ac.

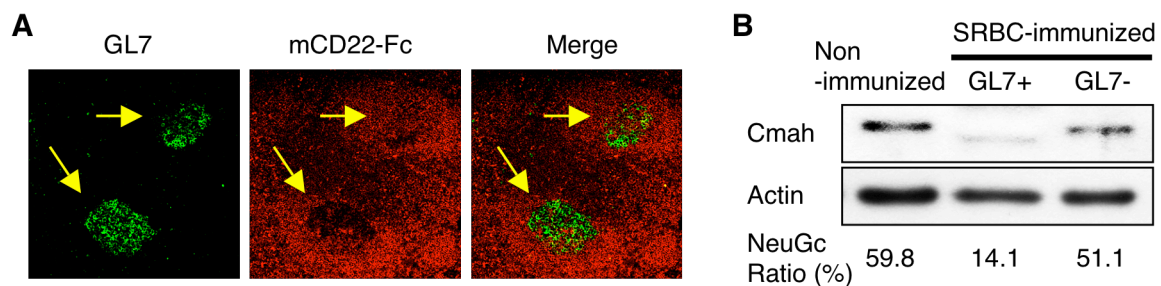
を発現しており、 $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸を含む糖鎖を多く発現している(24, 74)。それにも関わらず、非活性化 B 細胞が GL7 陰性であり、胚中心が特異的に GL7 で染色されるのは大きな謎である。マウスにおいて活性化 B 細胞特異的な GL7 エピトープの発現を可能にする機構は何であろうか？

ヒト B 細胞株が GL7 で強く染色されたことから、ヒトとマウスでのシアロ糖鎖の違いが、マウスにおける活性化 B 細胞特異的な GL7 エピトープの発現パターンをもたらす機構の解明の手がかりとなると考えられた。シアロ糖鎖に関してヒトとマウスで大きな違いが見られるのは、シアル酸の 5 位の炭素の修飾である。生体内に存在する主要シアル酸分子種は、Neu5Ac とその 5 位の修飾基中のアセチル基に酸素原子が一つ付加された Neu5Gc であり (Figure 0-1)、Neu5Ac が CMP-シアル酸の段階で Cmah という酵素により水酸化されることで、Neu5Gc の生合成が起こる(30)。ヒトでは *CMAH* 遺伝子の変異により Neu5Gc の発現が見られないが(9, 26)、マウスでは脳神経系を除く全身で Cmah が発現しており、臓器によって比率は異なるものの、Neu5Gc が主要シアル酸となっている (Figure 2-2)。そこで、非活性化時と活性化時 (胚中心) の B 細胞に対する GL7 結合性の違いをもたらす要因は、シアル酸分子種の違いにあるのではないかと考え、マウス胚中心における GL7 エピトープ発現の機構を検討した。



## 第一節 胚中心 B 細胞では主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へと変化する

胚中心において主要シアル酸分子種が変化しているか調べるため、まず GL7 とマウス CD22 のレクチンドメインを用いて胚中心の染色を行った。CD22 は生体内に存在するレクチンの一つであり、GL7 と同様に $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸に結合するが、マウスの CD22 は Neu5Gc を特異的に認識し、Neu5Ac との親和性は低いことが知られている(6)。そこで、マウス CD22 のレクチンドメイン (糖鎖結合ドメイン) にヒト IgG1 の Fc 領域を結合させたキメラ分子、mCD22-Fc を作製し、これを $\alpha$ 2-6 結合の Neu5Gc を検出するプローブとして用いた。マウスを T 細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球 (SRBC) で免疫すると、4~5 日目頃から二次リンパ器官である脾臓内の B 細胞領域に胚中心の形成が認められるようになり、約 10 日で最大となる(54)。そこで、SRBC による免疫 10 日後のマウスの脾臓凍結切片を作製し、GL7 および mCD22-Fc で共染色したところ、GL7 で強く染色される領域 (主に dark zone と考えられる(7)) は mCD22-Fc で染まらず、胚中心において $\alpha$ 2-6 結合の Neu5Gc が大きく減少していることが分かった (Figure 2-3A)。mCD22-Fc による染色の著しい減少が、胚中心におけるシアル酸分子種の変化を示しているのか明らかにするため、次に胚中心 B 細胞での Neu5Gc-Neu5Ac 比を調べた。SRBC で免疫したマウスから脾臓 B 細胞を調製し、さらに GL7 陽性細胞 (胚中心 B 細胞) と GL7 陰性細胞 (胚中心以外の B 細胞) を分取した。これらの細胞の膜画分における Neu5Gc、Neu5Ac の存在比を、DMB 法を用いた HPLC に



**Figure 2-3 Change in sialic acid species in germinal center B cells.**

(A) Spleen sections of SRBC-immunized mice (10 days after immunization) were costained with FITC-conjugated GL7 and mCD22-Fc precomplexed with R-PE-conjugated anti-human IgG. The mCD22-Fc is a chimeric probe that binds to the mouse CD22-ligand,  $\alpha$ 2,6-linked Neu5Gc. Arrows indicate germinal centers.

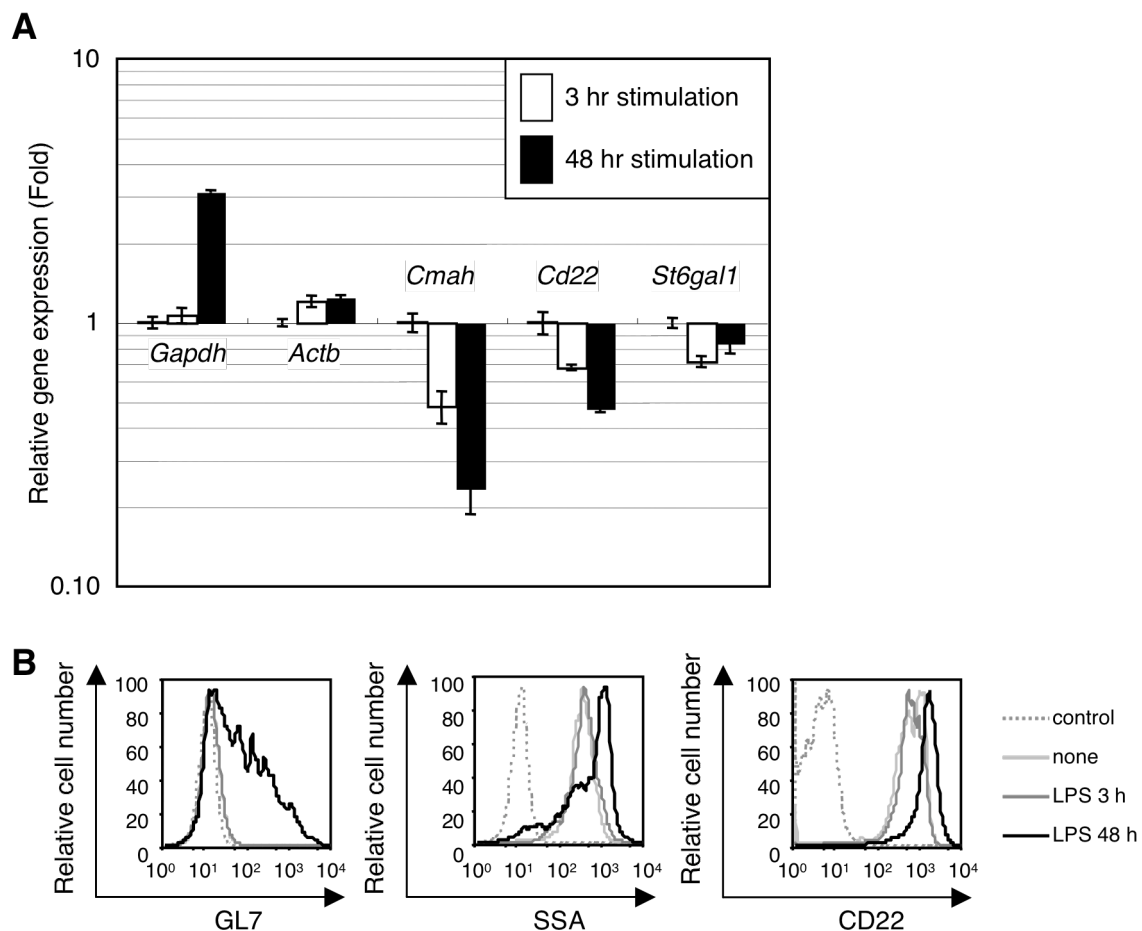
(B) GL7-positive germinal center cells and GL7-negative cells were prepared from a B-cell-enriched fraction derived from the spleen of a mouse 12 days after immunization with SRBC. Ultracentrifugation supernatant fractions (cytosolic fractions) of untreated mouse B cells (nonimmunized; control), GL7-positive B cells (GL7+), and GL7-negative B cells (GL7-) were subjected to immunoblotting with anti-mouse Cmab antibody and anti-actin antibody (to demonstrate equal loading of samples). The Neu5Gc/(Neu5Ac+Neu5Gc) ratio of the ultracentrifugation pellets (membrane fractions) of each cell type was measured by HPLC.

より測定したところ、胚中心では Neu5Gc の割合が大きく減少していた (Figure 2-3B)。一方、免疫後においても、GL7 陰性の非胚中心 B 細胞では、コントロールである免疫を行っていないマウスの B 細胞と比較して Neu5Gc-Neu5Ac 比に変化は見られなかった。そこで、胚中心における Neu5Gc の発現抑制機構を明らかにするため、Neu5Gc の生合成を担う酵素 Cmah の発現をウエスタンブロッティングで調べたところ、胚中心において Cmah の発現量が大きく減少していることが明らかになった (Figure 2-3B)。また、免疫をしていないコントロールマウスの B 細胞と比較して Neu5Gc-Neu5Ac 比に変化が見られなかった非胚中心 B 細胞では、Cmah の発現に関しても、やはりコントロールと同程度の発現が見られた。これらの結果から、マウスの胚中心 B 細胞では Cmah の発現抑制により、主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へと変化していることが明らかになった。GL7 が、主要シアル酸が Neu5Gc から Neu5Ac へと変化した胚中心を特異的に染めること、そして Neu5Ac のみを持つヒト B 細胞株を強く染めることから、GL7 は Neu5Gc と Neu5Ac との酸素原子一個の違いを見分け、Neu5Ac に特異的に結合することが示唆された。

## 第二節 Cmah の発現は LPS blast において mRNA レベルで減少する

Cmah の発現抑制によるシアル酸分子種の変化が胚中心の活性化 B 細胞における GL7 エピトープの発現をもたらしていることが示唆され、ここまでの結果から、GL7 エピトープの生合成に関わる酵素として、シアル酸の分子種の変換に関わる酵素 Cmah と糖鎖の末端にシアル酸を付加する酵素 St6gal1 の 2 つが同定された。そこで、マウスの活性化 B 細胞ではどちらの酵素の発現変化が GL7 エピトープの発現に大きく寄与しているか明らかにするため、次に、活性化 B 細胞における *Cmah* と *St6gal1* の mRNA の発現の変化を調べた。

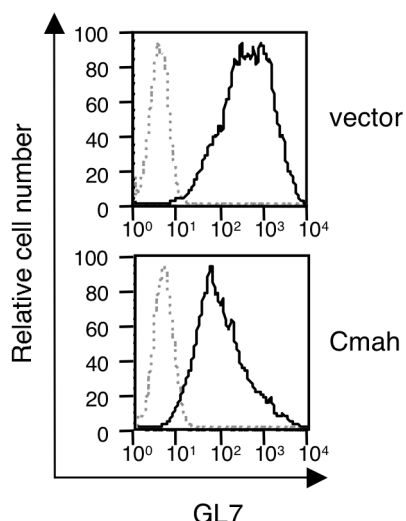
LPS を用いて *in vitro* で刺激した場合にも、B 細胞は GL7 陽性となるので (Figure 1-1)、この系を用いてリアルタイム PCR を行い、両酵素の mRNA の定量を行った。その結果、LPS で刺激した B 細胞では、刺激 48 時間後には、刺激をしていない B 細胞と比較して *Cmah* の発現が約 80%減少していた (Figure 2-4A)。Cmah の mRNA 減少は、LPS 刺激 3 時間後にすでに見られた。一方、*St6gal1* の mRNA の発現は、LPS で 48 時間刺激するとわずかに減少していたが (Figure 2-4A)、Sia $\alpha$ 2-6Gal/GalNAc を認識するレクチン、SSA で細胞を染色し、細胞表面の $\alpha$ 2-6 結合シアル酸の発現量を測定するとむしろわずかに増加していた (Figure 2-4B)。これらの結果から、活性化 B 細胞における GL7 エピトープの発現には、シアル酸の $\alpha$ 2-6 結合の生成に関わる *St6gal1* の発現調節よりも、シアル酸の分子種の変換に関わる *Cmah* の発現調節の方が優位に働いていることが示唆された。LPS で活性化させた細



**Figure 2-4 Downregulation of *Cmah* mRNA expression in primary cultured B cell blasts.** (A) Splenic B cells were stimulated with 30  $\mu$ g/ml LPS for the indicated times. Reverse-transcribed cDNAs prepared from total RNA of these cells were subjected to real-time PCR analysis. The expression levels of *Gapdh*, *Actb* (beta actin), *Cmah*, *Cd22* and *St6gal1* are shown as relative fold values compared with the mRNA expression in untreated B cells. (B) The same set of cells that was used to prepare total RNA was stained with GL7, SSA lectin, and anti-CD22. Gray dashed lines indicate negative controls for the staining.

細胞は、フローサイトメトリーの結果に示されているとおり、GL7 陽性 (GL7<sup>high</sup>+GL7<sup>low</sup>) 細胞と GL7 陰性細胞が混在した細胞集団である。したがって、実際に胚中心に存在する GL7 強陽性の B 細胞では、ここで見られた *Cmah* mRNA の減少よりもはるかに顕著な減少が起きていると考えられる。さらに、GL7 エピトープの発現における *Cmah* の重要性を確かめるため、LPS で活性化した B 細胞にレトロウイルスを用いて *Cmah* を強制発現させたところ、GL7 エピトープの発現が低下した (Figure 2-5)。また、LPS で 48 時間刺激するとグリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*Gapdh*) の発現量の増加が見られたが (Figure 2-4A)、これは LPS 刺激により細胞がブラスト化して大きくなり細胞質の容量が増えるのに加え、細胞の増殖が始まり物質代謝が盛んになるためと思われる。

第二章第一節で述べたように、マウスの CD22 は  $\alpha$ 2-6 結合の Neu5Gc をリガンドとする。



**Figure 2-5 Reduced expression of GL7 epitope by ectopic *Cmah* expression.**

*Cmah* was ectopically expressed in LPS-stimulated splenic B blasts using retrovirus. Retrovirus-infected cells were sorted and stained with FITC-conjugated GL7. Black solid lines indicate staining with GL7, and gray dashed lines indicate nonstaining controls.

CD22 の発現量は、mRNA レベルでは 48 時間後には 40% 近く減少していたが、タンパク質としての CD22 の細胞表面における発現量は、刺激していない細胞に比べてむしろ増加していた (Figure 2-4A, B)。

### 第三節 考察と総括

本章では、活性化 B 細胞特異的な GL7 エピトープの発現が生じる機構を検討した。第一章で、GL7 が  $\alpha 2-6$  結合のシアル酸を認識することを明らかにしたが、さらに第二章では、GL7 がシアル酸分子種を識別し、Neu5Ac を特異的に認識することを明らかにした。そして、第一章および第二章の結果から、GL7 の結合がシアル酸分子種依存かつシアル酸の結合様式依存であり、そのエピトープが *N*-結合型糖鎖上の Neu5Ac $\alpha 2-6$ LacNAc という構造であることが明らかとなった。

第一章で GL7 がヒト B 細胞株と強く結合したことから、本章では、ヒトとマウスにおける主要シアル酸分子種の違いに注目して、胚中心特異的な GL7 エピトープの発現機構の解明を試みた。その結果、胚中心 B 細胞において主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へとダイナミックに変化すること、そしてこのシアル酸分子種の変化を GL7 が認識し、胚中心 B 細胞特異的な結合を示すことを明らかにした。Neu5Gc から Neu5Ac へという細胞質内でのシアル酸分子種の変化を細胞表面に反映させるためには、新規合成タンパク質上に Neu5Ac を含む糖鎖を付加し、細胞表面へと送り出す必要がある。シアリルトランスフェラーゼは Neu5Ac と Neu5Gc を同様に基質として用いると考えられているので、細胞質内のシアル酸プール中の Neu5Ac/Neu5Gc 比が、新規合成糖タンパク質上の糖鎖に含まれる

Neu5Ac/Neu5Gc 比を決めることになる。Neu5Ac からの一方向の反応で生合成される Neu5Gc は、一般的に細胞内に蓄積しやすいと考えられている。しかし、リンパ球は細胞質の容量が小さくもともと細胞内のシアル酸のプールが少ないことに加え、胚中心では 6~7 時間という非常に速い速度で細胞周期がまわることから(22, 77)、すでに存在しているシアル酸のプールは比較的速く希釈されると思われる。さらに、活性化に伴い新規タンパク質の生合成も盛んに行われる(62)。Cmah の発現抑制に加え、これらの胚中心特有の性質が Neu5Gc から Neu5Ac への効率的な変換を可能にしたと考えられる。

本研究により、GL7 が糖鎖構造のみをエピトープとして認識することが明らかになったが、モノクローナル抗体として GL7 の樹立を行った Laszlo らの論文では、GL7 が細胞表面に存在する分子量 35 kDa のタンパク質を抗原として認識すると考えられた(35)。Laszlo らは、代謝標識を行った B 細胞由来タンパク質を用いた免疫沈降法により、この 35 kDa のタンパク質を GL7 の認識抗原と推定したことから、このタンパク質は、B 細胞の活性化時に活発に生合成され、急激に細胞表面上での発現量が増えるタンパク質である可能性が高い。たとえば、MHC class II 分子は B 細胞活性化時に細胞表面における発現が増えることが知られており、マウス B 細胞株を LPS で活性化させると MHC class II 分子 (I-A) の発現が転写レベルで増加することも明らかにされている(3)。MHC class II 分子には *N*-結合型糖鎖が付加されており(27, 29)、分子量としても 30 kDa 付近と比較的近いことから、これが GL7 の認識抗原とされた 35 kDa のタンパク質である可能性もある。

さらに、本章では、胚中心における GL7 エピトープの発現が、Neu5Ac から Neu5Gc への変換を担う酵素 Cmah の発現抑制によることを明らかにした。胚中心における Cmah の発現抑制機構はまだ明らかにされていないものの、LPS を用いて *in vitro* で活性化させた B 細胞では、定量 PCR 法により mRNA レベルでの Cmah の発現抑制が見られたことから、転写レベルでの発現制御が行われている可能性が示唆される。胚中心は B 細胞が抗体産生細胞や記憶 B 細胞へと分化する場であり、細胞表面に発現するタンパク質の種類などが大きく変化することから、胚中心で特異的に発現する転写因子も多い。Cmah の発現制御に関わるプロモーター領域などは未知であり、活性化 B 細胞特異的な Cmah の発現抑制機構の解明に向け、さらなる研究が必要である。非常に興味深いことに、脳神経系では、動物種の壁を越えて Neu5Gc の発現が抑制されている(58)。B 細胞における Cmah の発現制御機構の研究が、神経系における Neu5Gc 発現抑制機構の解明につながることを期待される。また、活性化 B 細胞と同様、活性化 T 細胞も GL7 で染色されることが報告されている。T 細胞でも活性化に伴って Cmah の発現が抑制され、Neu5Gc の発現が減少しているのか興味を持たれる。

マウスにおいて GL7 と並んで胚中心のマーカーとして用いられてきたものに、ピーナッツレクチン、PNA がある(56)。PNA は *O*-結合型糖鎖上の  $\beta$ -ガラクトースを認識する。PNA

は、マウスのみならず様々な動物種の胚中心を染めることが知られており、ヒトの胚中心も PNA 陽性である。ヒトの胚中心が GL7 で染色されるかどうかは不明であるが、今回同定された GL7 エピトープと同様に *N*-アセチルラクトサミン (CD75) に  $\alpha$ 2-6 結合でシアル酸 (Neu5Ac または Neu5Gc) が付加された糖鎖構造 (CD75s ; 旧名 CDw75 および CDw76) (4, 33)を認識するモノクローナル抗体の一つ (LN-1) が、ヒトの扁桃の胚中心を染めることが知られている(18)。また、糖脂質のグロボ系列に属する CD77 もヒトの胚中心 B 細胞に特異的に発現する(25, 60)。ここに挙げたような糖鎖認識抗体による活性化 B 細胞特異的な染色は、ヒトにおいても B 細胞の活性化時に糖鎖修飾の変化が起こっていることを示すものである。マウスでは Neu5Gc が主要シアル酸であるのに対し、ヒトでは全身で Neu5Gc の発現が見られないなど、ヒトとマウスでは糖鎖の構造や発現分布において異なる部分も多い。また、動物種による糖鎖の変化に合わせ、生体内レクチン分子が認識する糖鎖構造も動物種によって異なることが知られている。しかし、マウスだけではなくヒトにおいても B 細胞の活性化に伴い細胞表面の糖鎖が大きく変化するということから、B 細胞の機能における糖鎖の重要性が示唆される。

## 第四節 実験方法

### 試薬

ほとんどの試薬類は Wako Chemical (Japan) および Nacalai Tesque (Japan) から購入した。

### 抗体

R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated anti-mouse B220 (RA3-6B2)、R-PE-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG Fc、R-PE-conjugated streptavidin は CALTAG Laboratories (USA) から、FITC-conjugated GL7、biotin-conjugated anti-CD22 (Cy34.1) は BD PharMingen (USA) から、goat anti-actin polyclonal IgG は Santa Cruz Biotechnology (USA) から、HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG は ZYMED Lab (USA) から、HRP-conjugated donkey F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG は Amersham Life Science (UK) から購入した。FITC-conjugated *Sambucus sieboldiana* agglutinin (SSA) は生化学工業 (Japan) より購入した。

## マウス

SPF (specific pathogen-free) 環境下で飼育した C57BL/6J マウスを用いた。

## 凍結切片の作製と免疫組織染色

10~12 週齢のマウスに生理食塩水 100  $\mu$ l に懸濁したヒツジ赤血球 (緬羊保存血、日本生物材料センター)  $3 \times 10^8$  個を腹腔内注射し、免疫を行った。免疫 10 日後に脾臓を摘出し、Tissue-Tek OCT (22-oxyacalciol) compound (SAKURA Finetechnical, Japan) に包埋してドライアイス/エタノール中で凍結させた。Cryostat microtome (Leica Geosystems, Switzerland) を用いて厚さ 6  $\mu$ m の切片を作製し、MAS コートスライドガラス (MATSUNAMI, Japan) に貼り付けてアセトンで固定し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。この凍結切片を Tris-buffered saline (TBS) 中で水和させた後、5% BSA buffer (5% BSA, 0.05% Tween 20 in TBS) でブロッキングを行い、FITC 標識 GL7 および、R-PE 標識抗ヒト IgG 抗体とあらかじめ複合体を形成させた mCD22-Fc で染色した。染色した切片の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS, Japan) を用いた。

## 胚中心 B 細胞の単離

前述の方法に従い SRBC で免疫したマウス (免疫 12 日後) から脾臓細胞を調製し、まず CD90 (Thy1.2) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany) と反応させ、MACS depletion column (Miltenyi Biotec) を用いて Thy1.2 陽性細胞を除くことにより、B 細胞を得た。得られた B 細胞を、FITC 標識 GL7 抗体および anti-FITC MicroBeads (Miltenyi Biotec) と反応させ、MACS LS column (Miltenyi Biotec) を用いて GL7 陽性細胞と陰性細胞に分けた。これらの GL7 陽性 B 細胞 (胚中心 B 細胞)、GL7 陰性 B 細胞、そしてコントロール用の非免疫マウス由来 B 細胞を detergent-free lysis buffer (25 mM Tris-HCl [pH 7.6], 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque]) に溶解させ、超遠心 (約  $142,000 \times g$ , 30 分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を行った。超遠心後の上清 (サイトゾル画分) は Cmah のウエスタンブロッティングに、ペレット (膜画分) は HPLC によるシアル酸分子種の解析に用いた。

## ウエスタンブロッティングによる Cmah の検出

還元条件下で SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写後、5% BSA でブロッキングを行った。Cmah の検出には、一次抗体として抗マウス Cmah 抗体 (anti-N8 rabbit serum) を使用した(34)。シグナルの検出は、SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce, USA) を基質に用い、X 線フィルムに感光させて行った。

## HPLC

胚中心 B 細胞の解析では、超遠心後のペレット（膜画分）を 2 M 酢酸に懸濁させ、80℃で 2 時間インキュベートし、シアル酸を遊離させた。マウスの各臓器におけるシアル酸分子種の解析では、細かく切断した臓器を 2M 酢酸に懸濁させ、80℃で 3 時間インキュベート後、さらに 0.1 M の水酸化ナトリウムで処理し、シアル酸の O-アセチル化修飾を壊した。これらのシアル酸サンプルを Microcon YM-3 (Millipore, USA) を用いてフィルトレーションし、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB; Dojindo, Japan) で蛍光誘導化した。蛍光誘導体化されたシアル酸は、逆相カラム (TSK-GEL ODS-80TM; TOSOH, Japan) により分離し、LC10 HPLC システム (Shimadzu, Japan) を用いて測定した。

## リアルタイム PCR

未刺激、および LPS で刺激したマウス脾臓 B 細胞より調製した total RNA 2 µg から逆転写反応を行い、cDNA を得た。この cDNA を鋳型として QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN Japan, Japan) を用いて PCR を行い、ABI 7700 sequence detection system (Applied Biosystems Japan, Japan) で検出した。

リアルタイム PCR のサイクルは次のとおりである。

95℃, 15 分	} 40 サイクル
94℃, 15 秒,	
58/50℃, 30 秒	
72℃, 30 秒	

また、PCR に用いたプライマーは以下のとおりである。

<i>Cmah</i> ;	ZP-5, 5'-AGATTTACAAGGATTCC-3'
	ZP-E, 5'-CTTAAATCCAGCCCA-3'
<i>CD22</i> ;	PS-mCD22-6, 5'-CCTCCACTCCTCAGGCCAGA-3'
	PS-mCD22-E, 5'-GCCTATCCCATTGGTCCCT-3'
<i>St6gal1</i> ;	PS-ST6Gal-1, 5'-TCTTCGAGAAGAATATGGTG-3'
	PS-ST6Gal-A, 5'-GACTTATGGAGAAGGATGAG-3'
<i>Gapdh</i> ;	PS-GAPDH-1, 5'-GTGGAGATTGTTGCCATCAACG-3'
	PS-GAPDH-A, 5'-TCTCGTGGTTCACACCCATCAC-3'
<i>Actb</i> ;	PS-BACTIN-1, 5'-ACGATATCGCTGCGCTGGTC-3'
	PS-BACTIN-A, 5'-CATGAGGTAGTCTGTCAGGTC-3'



## フローサイトメトリー

第一章に記載した方法に準じて行った。

## レトロウイルスの作製と感染

マウスの *Cmah* cDNA を mouse stem cell virus (MSCV) プラスミドベクターに組み込み、パッケージング細胞である Plat-E 細胞(41)にトランスフェクションしてウイルスを含む培養上清を回収した。ここで用いた MSCV ベクターには、*Cmah* の後ろに internal ribosome entry site (IRES) をはさんでヒト CD4 (hCD4) の細胞外ドメインを組み込んでおり、ウイルス感染細胞は hCD4 陽性となる。LPS で 12~14 時間刺激したマウス脾臓 B 細胞を、DOTAP (Roche Diagnostics, Germany) を加えたウイルス液に懸濁し、32℃で 90 分間遠心してレトロウイルスを感染させ、LPS (30 µg/ml) を加えて 2~2.5 日培養した。その後、MACSelect 4 Micro Beads (Miltenyi Biotec, Germany) と MACS LS カラム (Miltenyi Biotec) を用いてレトロウイルスに感染した細胞を選択的に回収し、前述の方法に従いフローサイトメトリーを行った。

Plat-E 細胞は、東京大学医科学研究所の北村俊雄博士より恵与された。

### 第三章 *N*-グリコリルノイラミン酸欠損マウスの解析

胚中心における Neu5Gc の発現抑制が生理的にどのような意義を持つかを明らかにするには、B 細胞における Neu5Gc の機能を *in vivo* で明らかにすることが必要である。

筆者らの研究室では、Neu5Gc の欠失を目的として、Neu5Ac から Neu5Gc への変換を担う酵素、*Cmah* のノックアウトマウスを、neomycin 耐性遺伝子の挿入によるジーンターゲット法を用いて作製した。*Cmah* が担う水酸化反応は、シアル酸がゴルジ体に取り込まれる前に行われる。CMP-シアル酸をゴルジ体に取り込むトランスポーターや、シアル酸を糖鎖に付加するシアリルトランスフェラーゼは、Neu5Ac、Neu5Gc に対し目立った特異性を持たず、両者を同様に基質として用いると考えられている(66)。*Cmah* による水酸化反応以外に Neu5Gc を生合成する経路は知られておらず、また細胞外からのシアル酸の取り込みもわずかであると考えられる。したがって、*Cmah* ノックアウトマウスは、シアル酸の発現量や糖鎖へのシアル酸の結合様式を変化させることなく、シアル酸の分子種のみを変化させることができると期待された。

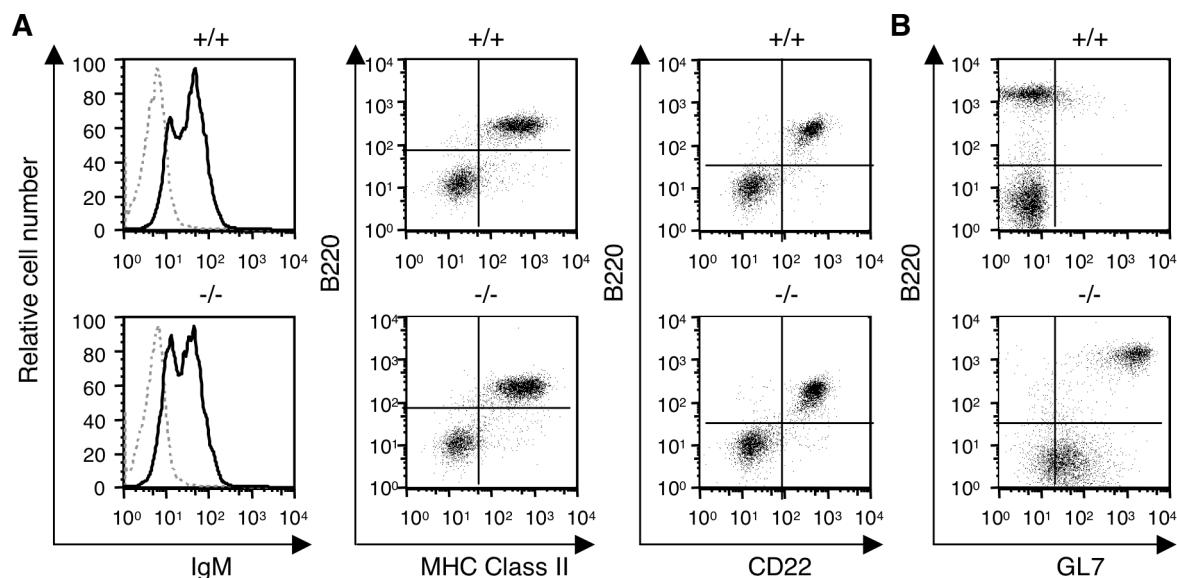
ヘテロの F1 マウスどうしの掛け合わせによりノックアウトマウスを作製すると、若干ヘテロおよびノックアウトマウス数が少ないものの（野生型：ヘテロ：ノックアウト＝508:881:449）、ノックアウトマウスの誕生は正常であった。また、SPF（specific pathogen-free）環境下で飼育する限り、その成長にも異常は見られなかった。これまでの研究により、*Cmah* ノックアウトマウスは全身で Neu5Gc の発現を欠いていることが確認され、*Cmah* が Neu5Gc の生合成を一手に担っていることが個体レベルで明らかにされた。この結果は、ヒトのみで生じている *CMAH* 遺伝子の変異により、活性を持つ *CMAH* タンパク質を失ったことが、ヒトにおける Neu5Gc の欠損の原因であることを証明するものであった。

第二章で、胚中心 B 細胞において *Cmah* の発現が抑制され Neu5Gc が減少することが明らかになったことから、まず B 細胞に注目してノックアウトマウスの表現系の解析を行った。

#### 第一節 *Cmah* ノックアウトマウスにおけるリンパ球の発達は正常である

免疫系に注目して血液学的検査やリンパ器官内の細胞のフローサイトメトリーによる解析を行ったところ、B 細胞、T 細胞の分化、成熟など免疫系の発達は、*Cmah* ノックアウトマウスにおいて正常であった（data not shown）。

また、B 細胞表面上の IgM、MHC class II、CD22 の発現も調べたが、野生型マウスと *Cmah*



**Figure 3-1 Flow cytometry profile of *Cmah*<sup>-/-</sup> mice splenocytes.**

The expression of IgM, MHC class II, CD22 and GL7 epitope on splenocytes from wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice was detected by flow cytometry. Black solid lines indicate staining with anti-IgM, and gray dashed lines indicate nonstaining controls (A). In anti-MHC class II, anti-CD22 and GL7 staining, splenocytes were costained with anti-B220, a marker for B cells (A and B). Genotypes are indicated as follows: +/+, wild-type; -/-, *Cmah*<sup>-/-</sup> (A and B).

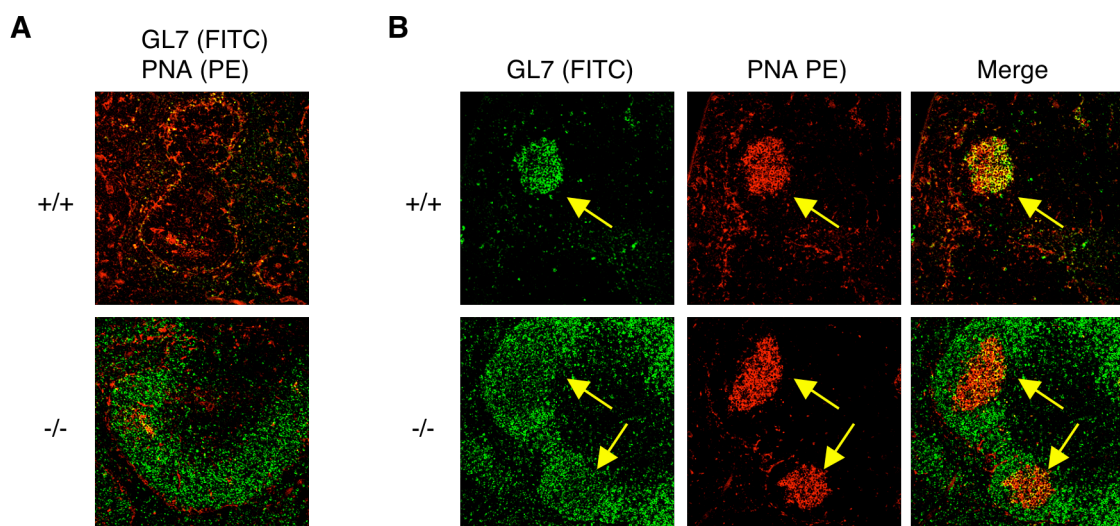
ノックアウトマウスで特に変化は認められなかった (Figure 3-1A)。さらに B 細胞の活性化マーカーについても検討したところ、野生型マウスと違いが見られたのは GL7 のみであった (Figure 3-1B)。GL7 は、第二章により Neu5Ac を特異的に認識することが明らかになったことから、ノックアウトマウスにおけるシアル酸分子種の変化を検出しているものと考えられた。

## 第二節 *Cmah* ノックアウトマウスでの胚中心の形成は正常である

胚中心では *Cmah* の発現抑制により Neu5Gc の発現が低下し、このシアル酸の変化が胚中心のマーカーとして用いられてきた GL7 で検出されることが明らかとなった。*Cmah* ノックアウトマウスでは常に Neu5Gc の発現を欠いており、GL7 エピトープを強く発現している (Figure 3-1B)。一方、野生型マウスでは、GL7 陰性の成熟細胞が胚中心で GL7 陽性となり、CD79b 陽性記憶 B 細胞となると再び GL7 陰性となる(63)。そこで、活性化前から GL7 エピトープを発現している *Cmah* ノックアウトマウスにおいて、胚中心の形成が正常に起こるのかどうか調べた。

マウスにおいて、GL7 以外に胚中心のマーカーとして広く用いられているものに、ピーナ

ツツ (*Arachis hypogaea*) 由来レクチン、PNA がある(56)。PNA は、O-結合型糖鎖のコア 1 糖鎖末端に存在する $\beta$ -ガラクトースを認識して結合する。*Cmah* ノックアウトマウスでは免疫の有無に関わらず GL7 エピトープを発現していると考えられるため、これら 2 つの胚中心マーカー、GL7 および PNA による脾臓凍結切片の染色を比較することにした。まず、非免疫時の脾臓の凍結切片を染色したところ、野生型マウスでは PNA により辺縁帯 (marginal zone) がわずかに染まるものの、GL7 による染色は全く見られなかった (Figure 3-2A)。これに対し、*Cmah* ノックアウトマウスでは、フローサイトメトリーの結果 (Figure 3-1B) から予想されるとおり、B 細胞領域 (濾胞) 全体が GL7 で染まった。次にマウスを T 細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球 (SRBC) で免疫し、胚中心の形成を調べたところ、野生型マウスでは GL7 で染まる胚中心の形成が見られた (Figure 3-2B)。また、PNA による染色では、辺縁帯の弱い染色に加え、胚中心と思われる領域が強く染まった。GL7 と PNA による染色結果を重ね合わせると、両者はほぼ重なる領域を染めものの、染まる細胞集団は完全には一致していないことが明らかとなった。一方、*Cmah* ノックアウトマウスでは、非免疫時と変化はなく B 細胞領域全体が GL7 で染まった。これに対し、PNA 陽性領域は、*Cmah* ノックアウトマウスでも野生型マウスと同様に観察された。この結果から、*Cmah* ノックアウトマウスでは、Neu5Gc を欠損することにより B 細胞が常に GL7 陽性となっているため、GL7 を胚中心のマーカーとして用いて組織染色を行うと胚中心の形成が異常であるように見



**Figure 3-2. Change in staining of germinal center marker, GL7, and normal germinal center formation in SRBC-immunized *Cmah*<sup>-/-</sup> mice.**

(A) Histochemical analyses of spleen sections without immunization. Spleen sections from wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice were costained with FITC-conjugated GL7 and biotin-conjugated PNA followed by R-PE-conjugated streptavidin. Genotypes are indicated as follows: +/+, wild-type; -/-, *Cmah*<sup>-/-</sup> (A and B).

(B) Histochemical analyses of spleen sections after T-dependent immunization. Wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice were immunized with SRBC, and the spleens were removed 8 days after immunization. The frozen spleen sections were costained with GL7 and PNA as described above. Arrows indicate germinal centers.

**Table 2. Serum Ig isotype levels of nonimmunized *Cmah*<sup>-/-</sup> mice**

Serum Ig level (μg/ml)<sup>a</sup>

Isotype	Wild-type	Heterozygote	<i>Cmah</i> <sup>-/-</sup>
IgM	169.6 ± 24.7	205.3 ± 38.9	190.0 ± 33.3
IgG <sub>1</sub> <sup>b</sup>	115.5 ± 14.9	151.3 ± 19.5	197.4 ± 41.2
IgG <sub>3</sub>	20.4 ± 2.3	23.9 ± 3.1	19.6 ± 3.8
IgA	242.7 ± 9.7	280.0 ± 29.2	260.2 ± 10.6

<sup>a</sup> Serum Ig levels were measured in nonimmunized mice at 7-13 week of age (at least 20 per genotype). Values are expressed as the mean ± standard errors of the means.

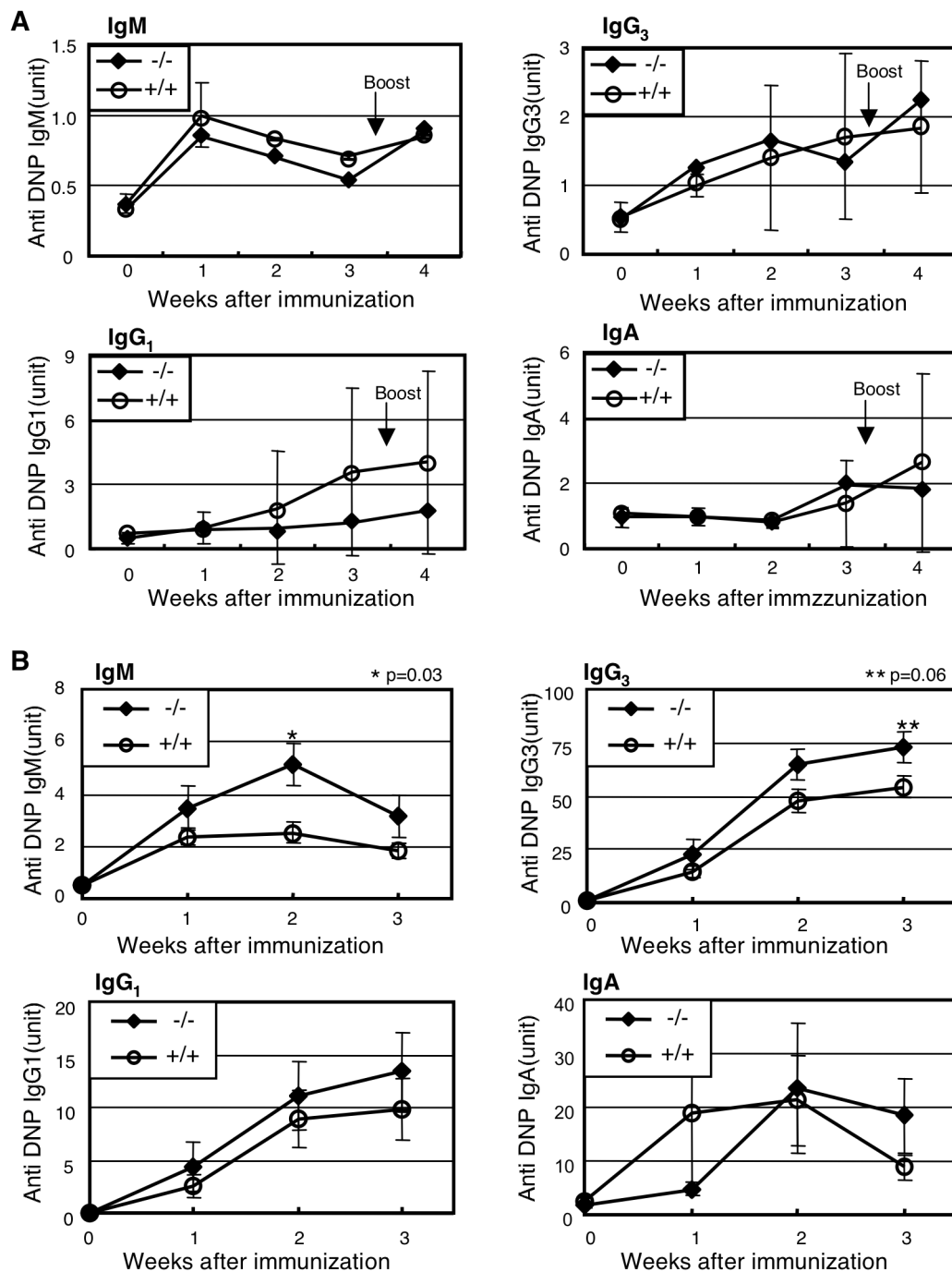
<sup>b</sup> The serum IgG<sub>1</sub> level was slightly increased in *Cmah*<sup>-/-</sup> mice (Student's *t*-test; *P* = 0.074 for wild-type vs. *Cmah*<sup>-/-</sup>).

えるが、胚中心の形成は正常に起こっていると考えられた。

### 第三節 *Cmah* ノックアウトマウスでは T 細胞非依存性抗原による免疫時の抗体産生が亢進している

*Cmah* ノックアウトマウスにおける B 細胞の分化は正常であったが、血清中の抗体量をサンドイッチ ELISA 法により測定したところ、ノックアウトマウスで IgG1 抗体の増加が見られた (Table 2)。そこで、Neu5Gc 欠損のもたらす影響を個体レベルで解析するため、次にマウスを免疫した時の抗体産生を測定した。

第二章で、胚中心において Neu5Gc の発現が抑制されることが明らかになったことから、まず胚中心の形成が起こる T 細胞依存性抗原に対する応答を調べた。フロインド完全アジュバントを用いて T 細胞依存性抗原 DNP-KLH でマウスを免疫し、血清中の抗 DNP 抗体量を ELISA 法で測定したところ、野生型マウスとノックアウトマウスとで抗体産生量に差は見られなかった (Figure 3-3A)。T 細胞依存性抗原による免疫時には胚中心が形成され、この胚中心において B 細胞が活発に増殖し、抗体産生細胞へと分化する。*Cmah* ノックアウトマウスにおいても胚中心が形成されること、そして胚中心の B 細胞においては、野生型マウスでも *Cmah* の発現抑制により Neu5Gc の発現が抑制され、シアル酸分子種の違いという *Cmah* ノックアウトマウスと野生型マウスの差がなくなることから、T 細胞依存性抗原に対する応



**Figure 3-3. Antibody production upon T-dependent and T-independent immunization.**

(A) DNP-KLH in complete Freund's adjuvant was used to immunize 8-week-old mice. Arrows indicate the time of secondary immunization with DNP-KLH. Serum was collected each week and analyzed for reactivity with DNP-conjugated BSA coated on ELISA plates. The titer of hapten-reacting mouse Igs from each animal was determined by isotype-specific ELISA. The measured absorbance at 405 nm was normalized to anti-DNP units by comparison with the value from standard pooled serum against DNP on the same plate. The results are presented as the mean responses of 10 animals for each genotype measured in two sets of experiments. The bars represent standard errors of the means. Open circles indicate the responses of wild-type mice, and filled diamonds indicate the responses of *Cmah*<sup>-/-</sup> mice for each isotype (A and B). Genotypes are indicated as follows: +/+, wild-type; -/-, *Cmah*<sup>-/-</sup> (A and B).

(B) DNP-Ficoll was used to immunize 8-week-old mice. The titers of hapten-reacting mouse Igs from each animal were determined by isotype-specific ELISA as above.

答に差が見られなかったと考えられた。

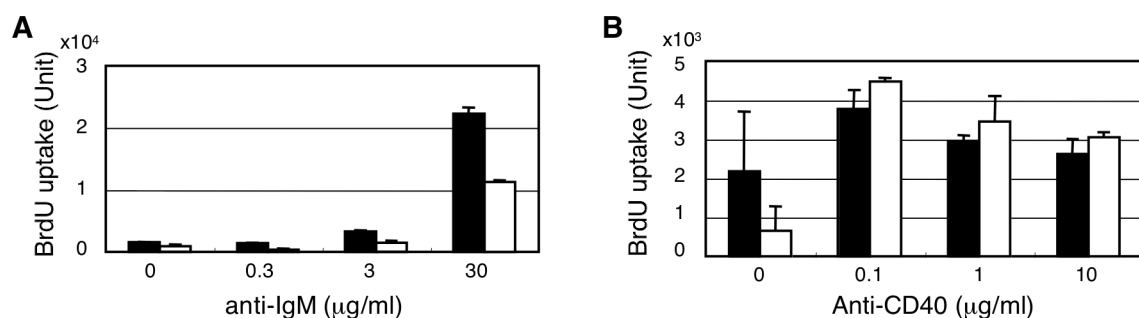
一方、T 細胞非依存性抗原 (T-II 抗原) である DNP-Ficoll で免疫を行った場合には、野生型マウスと比較し *Cmah* ノックアウトマウスで抗体産生の亢進が見られ (Figure 3-3B)、ノックアウトマウスでは B 細胞の活性化が亢進している可能性が示唆された。

#### 第四節 *Cmah* ノックアウトマウスでは B 細胞の増殖が亢進している

B 細胞は、活性化すると素早く大量に増殖して抗体を産生し、免疫応答に関わる。*Cmah* ノックアウトマウスで T 細胞非依存性抗原に対する抗体産生の亢進が見られたことから、次に、脾臓から単離した B 細胞を *in vitro* で刺激し、ブロモデオキシウリジンの取り込みを指標にその増殖を測定した。

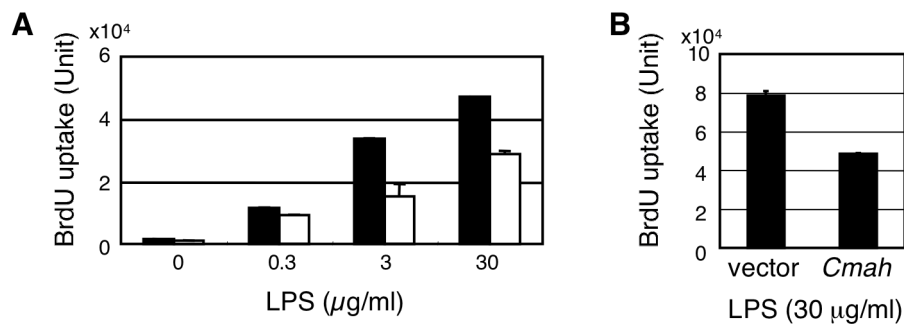
抗 IgM 抗体により B 細胞受容体 (BCR) を刺激すると、ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して増殖の亢進が見られた (Figure 3-4A)。抗 IgM 抗体による刺激は B 細胞をポリクローナルに活性化するため、T 細胞非依存性抗原による B 細胞活性化に近い状態を見ていると考えられる。一方、T 細胞依存性抗原による活性化を模倣していると考えられる抗 CD40 抗体を用いて同様に脾臓 B 細胞を刺激したところ、ノックアウトマウスと野生型マウスの B 細胞の増殖の差はほとんど見られなくなった (Figure 3-4B)。これらの結果から、Neu5Gc を介した B 細胞活性化の負の制御は、刺激の種類に依存しており、とくに T 細胞非依存性抗原に対する応答に関わることが示唆された。

*Cmah* ノックアウトマウスで見られた増殖の亢進が *Cmah* の欠失の結果であることを確認するため、次にノックアウトマウスの B 細胞に *Cmah* を強制発現させ、増殖の変化を測定し



**Figure 3-4. *In vitro* hyperproliferation response of *Cmah*<sup>-/-</sup> B cells upon B cell receptor stimulation.** Splenic B cells from wild-type (open columns) and *Cmah*<sup>-/-</sup> (filled columns) mice were assessed for proliferation using the F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse IgM (µ chain) (A) or anti-CD40 (B) as stimulating reagents. After stimulation for 24 h, bromodeoxyuridine (BrdU) was added. Following incubation for overnight, incorporated BrdU was detected by ELISA. Data are shown as the means of triplicate cultures, and the bars represent standard errors of the means.





**Figure 3-5. Rescue of augmented proliferation of *Cmah*<sup>-/-</sup> B cells by *Cmah* expression.**

(A) Splenic B cells from wild-type (open columns) and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice (filled columns) were assessed for proliferation using LPS from *Salmonella enterica* as the stimulating reagent. Proliferation assays were performed as described in the legend of Figure 3-4. Data are shown as the means of triplicate cultures, and the bars represent standard errors of the means (A and B).

(B) *Cmah* was ectopically expressed by mouse stem cell virus in *Cmah*<sup>-/-</sup> splenic LPS B blasts. After being cultured for 2.5 days in the presence of 30 µg/ml LPS, the virus-infected B cells were subjected to proliferation assay. As a control, cells were infected with an empty vector.

た。脾臓 B 細胞などの初代培養細胞では、通常のトランスフェクション法により外来遺伝子を発現させることは困難であるが、増殖中の細胞であればレトロウイルスを用いて比較的高い効率で外来遺伝子を導入することが可能である。T 細胞非依存性抗原である LPS で B 細胞を刺激すると、多くの細胞で細胞周期がまわり、増殖が誘導される。LPS で脾臓 B 細胞を活性化した場合にもノックアウトマウスで増殖の亢進が見られたことから (Figure 3-5A)、LPS で活性化させた *Cmah* ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞にレトロウイルスの系を用いて *Cmah* を強制発現させ、その増殖を測定した。その結果、空ベクターを導入したコントロールと比較して、*Cmah* を導入した B 細胞では増殖の低下が見られた (Figure 3-5B)。この結果から、*Cmah* ノックアウトマウスで見られた B 細胞増殖の亢進は、*Cmah* の発現を失ったことによるものであること、つまり Neu5Gc を失ったことが増殖の亢進をもたらしていることが確認された。また、この系では、LPS により活性化させた B 細胞の同一プールを、レトロウイルス感染時に 2 つに分け、片方にコントロール、もう一方に *Cmah* を発現させるレトロウイルスを導入しているため、両方で B 細胞集団に差が生じない。このことから、野生型マウスとノックアウトマウスで見られた増殖の差は、B 細胞サンプルに含まれる細胞集団の差異によるものではないことが確認された。

## 第五節 *Cmah* ノックアウトマウスでは Siglec リガンドの発現量が変化している

Neu5Gc 含有糖鎖による B 細胞活性化の制御には、Neu5Gc の発現を失うことによりリガンドとの相互作用などにおいて影響を受ける分子が関わっていると考えられるので、次に、

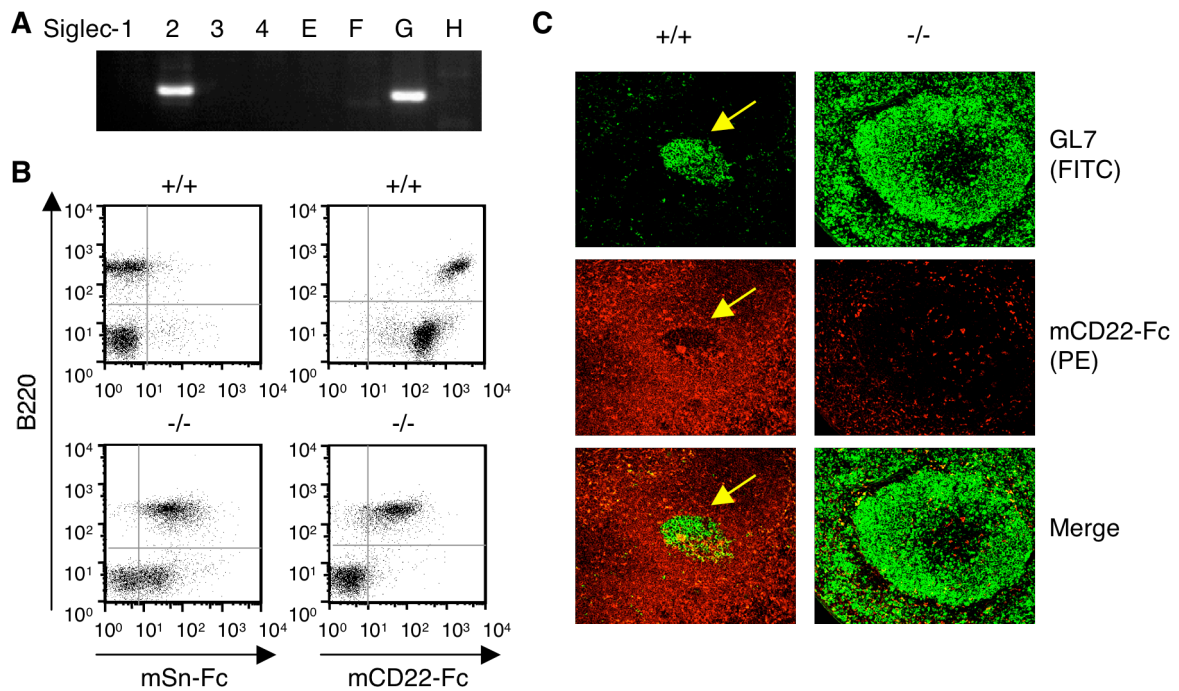


*Cmah* ノックアウトマウスにおけるシアル酸分子種の変化を認識する分子の検討を行った。Neu5Gc がマウスにおける主要シアル酸分子種であることから、Neu5Gc から Neu5Ac へというシアル酸分子種の変化により影響を受ける分子間認識は、数多く存在する可能性がある。ここまでの実験により、Neu5Gc が B 細胞の増殖に対し負に働いていることが示されたが、増殖は脾臓から単離した B 細胞のみを用いて測定しているので、Neu5Gc をもつ糖鎖を認識し増殖に抑制的に働く分子として候補になるのは、その分子、およびリガンドとなる糖鎖の双方が B 細胞上に発現している分子である。

このような分子の候補としてまず考えられたのが、シアル酸を認識する分子ファミリーの一つである Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) である(12, 13, 71)。マウスでは現在 8 種の分子 (Siglec-1, 2, 3, 4, E, F, G, H) が同定されており、神経系の細胞に特異的に発現する MAG (Siglec-4) を除き、主として免疫系の細胞に発現が見られる。

それらのうち、B 細胞に特異的に発現する CD22 (Siglec-2) は、 $\alpha$ 2-6 結合のシアル酸をリガンドとして結合することが知られており、マウスにおいては Neu5Gc に特異性を示す(6, 32)。また、細胞内に ITIM (immuno-receptor tyrosine-based inhibitory motif) と呼ばれる抑制性モチーフを持ち、B 細胞の活性化を負に制御する分子と考えられていることから(45)、*Cmah* ノックアウトマウスで見られる表現系に関与している可能性が示唆された。また、Siglec-G も B 細胞に発現しているという報告がある(11)。そこで、まず B 細胞に発現している Siglec 分子を調べるため、マウス成熟 B 細胞株である X16c8.5 細胞から cDNA を調製し、RT-PCR を行ったところ、すでに B 細胞での発現が報告されている CD22 と Siglec-G の発現が見られた (Figure 3-6A)。

そこで、次に、各 Siglec 分子のリガンド認識部位にヒト IgG1 の Fc 部分を結合させたキメラ分子を用いて、フローサイトメトリーにより脾臓細胞における Siglec リガンドの発現量を測定した。Neu5Gc を持たない *Cmah* ノックアウトマウスでは、予想通り mCD22-Fc による染色が大きく減少し、CD22 のリガンドを失っていることが分かった (Figure 3-6B)。しかし、ノックアウトマウスの B 細胞でも、野生型マウスの約 1/40 の蛍光強度ではあるが、mCD22-Fc の結合が見られた。これは、CD22 が親和性は低いながらも Neu5Ac と結合するためと思われる(6)。ここで用いた Siglec-Fc プローブは、Lec2 というシアル酸付加欠損細胞を用いて作製したものであり、非常に高い感度で Siglec リガンドを検出することができる。実際、Siglec-Fc 自身にもシアル酸が付加される COS7 細胞で mCD22-Fc プローブを作製すると、ノックアウトマウスの細胞への結合は見られなかった (data not shown)。また、SRBC で免疫したマウスの脾臓凍結切片の染色も行ったところ、野生型マウスでは GL7 陽性の胚中心を除き B 細胞領域全体が mCD22-Fc で染まったのに対し、ノックアウトマウスの脾臓切片は全く染色されなかった (Figure 3-6C)。一方、B 細胞上に発現が見られるも



**Figure 3-6 Loss of optimal CD22 ligand in *Cmah*<sup>-/-</sup> mice.**

(A) The expression of Siglec molecules (Siglec-1~4, E~H) in a mouse mature B-cell line, X16c8.5, was detected by RT-PCR.

(B) The expression of surface ligands for sialoadhesin (Sn) and CD22 was detected by flow cytometry. Splenocytes from wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice were costained with FITC-conjugated anti-B220 and mSn/mCD22-Fc precomplexed with R-PE-conjugated anti-human IgG. Wild-type B cells were strongly stained with mCD22-Fc. In contrast, the level of mCD22-Fc staining showed a marked decrease in *Cmah*<sup>-/-</sup> mice. The weak signal found on *Cmah*<sup>-/-</sup> splenocytes was detected only with the chimeric probe mCD22-Fc prepared from Lec2 cell culture medium and not with the probe prepared from COS7 cells, possibly because of the autosialylation. Genotypes are indicated as follows: +/+, wild-type; -/-, *Cmah*<sup>-/-</sup> (B and C).

(C) Spleen sections from wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice 8 days after SRBC immunization were costained with FITC-conjugated GL7 and mCD22-Fc precomplexed with R-PE-conjugated anti-human IgG. Arrows indicate germinal centers.

う一つの Siglec 分子、Siglec-G については、脾臓細胞上にリガンドの発現が見られなかった (data not shown)。

Neu5Ac と Neu5Gc の違いを見分けることが知られている Siglec 分子としては、CD22 の他に sialoadhesin (Siglec-1、CD169)、MAG がある(6)。sialoadhesin はマクロファージ上に発現し、 $\alpha 2-3$  結合の Neu5Ac を特異的に認識する。他の Siglec 分子と異なり、細胞内領域が非常に短くシグナル伝達に関わるドメインを持たない一方で、細胞外領域が非常に長いことから、他の細胞との接着に関わっていると考えられている。Neu5Ac の発現量が増加している *Cmah* ノックアウトマウスの脾臓細胞では、予想通り sialoadhesin のリガンド量が増加しており、マクロファージの接着などに変化が生じる可能性が示された (Figure 3-6A)。MAG も Neu5Ac に特異性を示すが、MAG が発現する神経系の細胞にはもともと Neu5Gc が発現していないため、*Cmah* 遺伝子の欠失による Neu5Gc 欠損の影響はほとんど

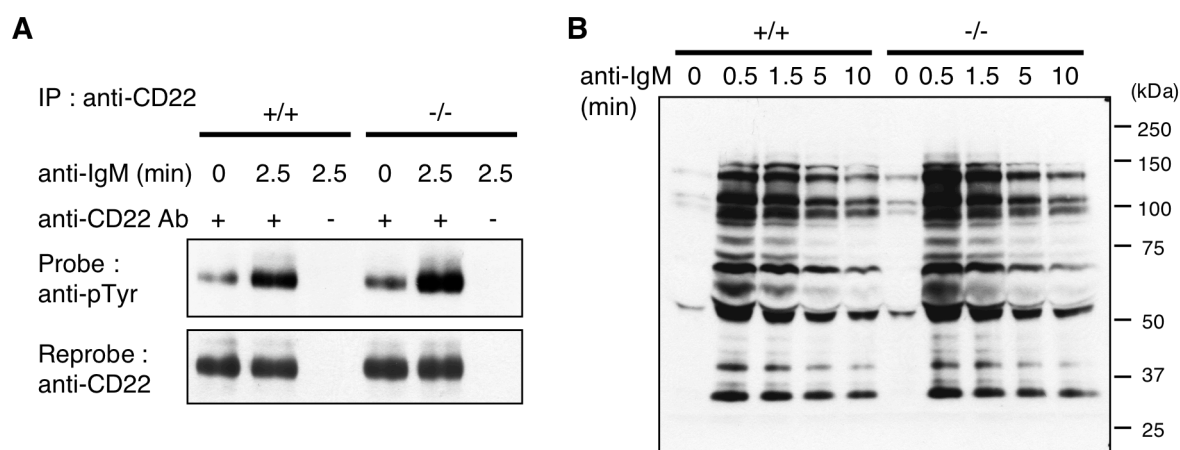
ないと考えられる。

以上の結果より、B細胞において *Cmah* 遺伝子欠失の影響を受ける糖鎖リガンドーレセプター結合のうち、Siglec が関与するものは、CD22 のリガンドの消失であることが示唆された。

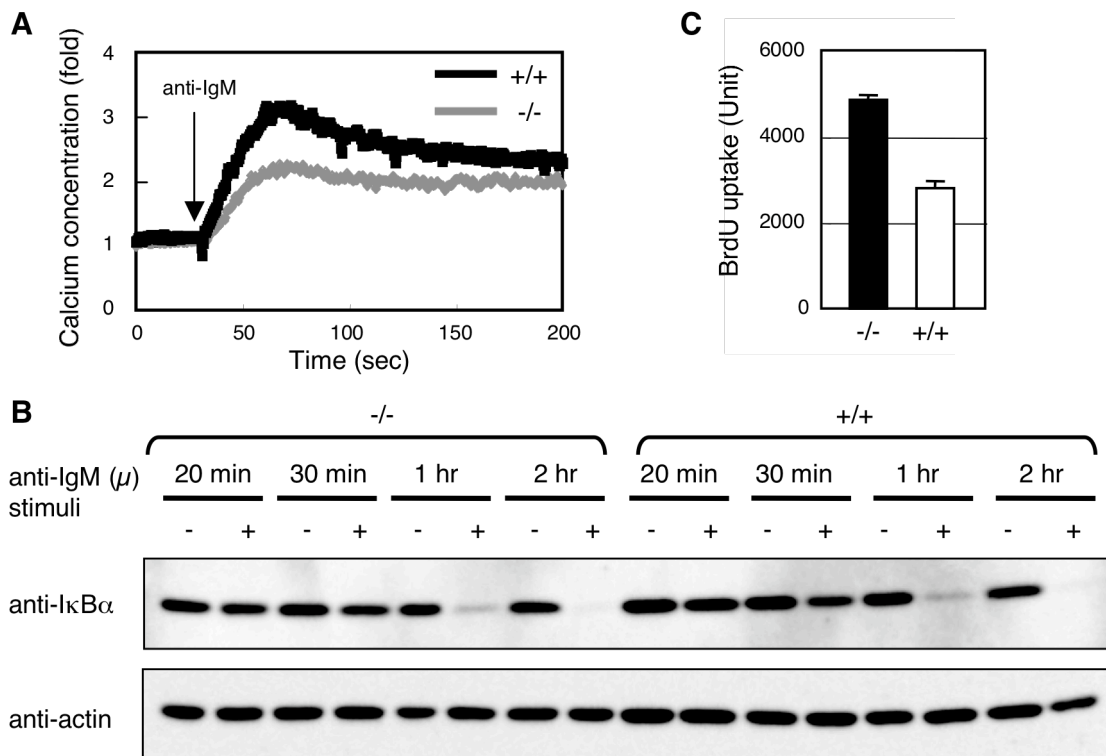
## 第六節 *Cmah* ノックアウトマウスのB細胞受容体刺激時のチロシンリン酸化は正常である

CD22 は細胞内領域に ITIM と呼ばれるドメインを持っており、B細胞受容体が架橋されると、Lyn キナーゼにより ITIM 中のチロシンがリン酸化され、チロシンフォスファターゼである SHP-1 をリクルートすることにより、B細胞受容体を介したシグナル伝達を負に制御していると考えられている(14, 45, 50, 59, 65, 72)。

*Cmah* ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較してB細胞受容体の発現に差が見られなかったことから (Figure 3-1A)、脾臓B細胞のB細胞受容体を抗IgM抗体により刺激し、CD22 のリン酸化を調べた。CD22 を免疫沈降し、そのリン酸化状態を抗リン酸化チロシン抗体で検出したところ、*Cmah* ノックアウトマウスでも野生型マウスと同様にCD22 のリン酸化が起こっていた (Figure 3-7A)。ただし、CD22 には複数のチロシンリン酸化部位



**Figure 3-7 Normal tyrosine phosphorylation upon B cell receptor cross-linking in *Cmah*<sup>-/-</sup> mice.**  
 (A) Splenic B cells were stimulated with the F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse IgM (μ chain) for the indicated times and cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-CD22 antibody (Cy34.1). The precipitated proteins were immunoblotted with anti-phosphotyrosine (pTyr) antibody (PT-66) and then re-probed with anti-CD22 polyclonal antibody. IP, immunoprecipitation. Genotypes are indicated as follows: +/+, wild-type; -/-, *Cmah*<sup>-/-</sup> (A and B).  
 (B) Splenic B cells from wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice were stimulated with the F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse IgM (μ chain) for the indicated times. Whole-cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (PT-66).



**Figure 3-8. Reduced calcium mobilization and hyperproliferation response to calcium signaling of *Cmah*<sup>-/-</sup> B cells.**

(A) Splenic B cells from wild-type (black) and *Cmah*<sup>-/-</sup> (gray) mice were labeled with a fluorescent indicator, Indo 1-AM, and stimulated with the F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse IgM ( $\mu$  chain). The arrow indicates the time of stimulation. The Ca<sup>2+</sup> concentration was plotted as a function of time. The figure shows the data from one of several reproducible experiments using 10  $\mu$ g/ml anti-IgM for stimulation, though various concentrations of anti-IgM were examined. Genotypes are indicated as follows: +/+, wild-type; -/-, *Cmah*<sup>-/-</sup> (A to C).

(B) Splenic B cells from wild-type and *Cmah*<sup>-/-</sup> mice were stimulated with the F(ab')<sub>2</sub> fragment of anti-mouse IgM ( $\mu$  chain) for indicated times in the continuous presence of cycloheximide. Whole-cell lysates were subjected to immunoblotting with anti-IkB $\alpha$  and anti-actin (equivalent loading control).

(C) Splenic B cells were assessed for proliferation using TPA (10 ng/ml) plus ionomycin (5  $\mu$ g/ml) as stimulating reagents. The proliferation assay was performed as described in the legend of Figure 3-4. Data are shown as the means of triplicate cultures, and the bars represent standard errors of the means.

があり、それぞれの部位のリン酸化は異なるシグナル伝達物質をリクルートすることが知られている(50, 51, 75)。また、最近、CD22の複数のチロシンリン酸化部位には、糖鎖リガンド依存的にリン酸化される部位と非依存的にリン酸化される部位があるという可能性も示唆されてきており、どのチロシンがリン酸化されているかをより詳細に調べれば、野生型マウスとの違いが見られる可能性もある。CD22の関与の有無に関わらず、*Cmah*ノックアウトマウスで野生型マウスと差の見られるシグナル伝達分子を同定するため、抗IgM抗体によるB細胞受容体刺激時の全体的なチロシンのリン酸化も検出したが、リン酸化の程度、経時変化ともに差は見られなかった (Figure 3-7B)。

タンパク質のチロシンリン酸化と並びB細胞受容体刺激時の即時応答としてよく知られて

いるのが、細胞内小胞からのカルシウムの放出と、それが引き金となって引き起こされる細胞外からのカルシウム流入による、細胞内カルシウム濃度の上昇である。そこで、次に抗 IgM 抗体による刺激時の細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。すると、増殖の亢進から予想される結果とは逆に、B 細胞受容体刺激時のカルシウム濃度の上昇は、野生型マウスよりも *Cmah* ノックアウトマウスの方が低かった (Figure 3-8A)。カルシウム流入の下流で生じるシグナルとして PKC の活性化が存在し、この PKC の下流の経路の一つに NF- $\kappa$ B 経路がある。NF- $\kappa$ B は IKK によりリン酸化された I $\kappa$ B が分解されることにより活性化し、核に移行して細胞の生存に関与することが知られている(2, 44, 73)。ノックアウトマウスで、野生型マウスに対しカルシウム流入の低下が見られたので、B 細胞受容体刺激時の I $\kappa$ B の分解をウェスタンブロットティングにより調べた。すると、カルシウム流入に差があるにもかかわらず、I $\kappa$ B の分解の速度や程度は野生型マウスと同等であった (Figure 3-8B)。さらに、イオノマイシンと TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) を用いて脾臓 B 細胞を刺激し、細胞外からのカルシウム流入と PKC の活性化を強制的に引き起こした際の B 細胞の増殖を測定したところ、*Cmah* ノックアウトマウスで増殖の亢進が見られた (Figure 3-8C)。この結果は、カルシウムの流入が同程度であっても増殖の差が生まれることを示している。したがって、Neu5Gc を失ったことによりその活性化が変化し、ノックアウトマウスの B 細胞で増殖亢進をもたらしている分子は、NF- $\kappa$ B 以外の経路上に存在する、PKC の下流の分子である可能性が示唆された。

## 第七節 考察と総括

本章では、B 細胞における Neu5Gc の機能を明らかにするため、Neu5Gc を欠失している *Cmah* ノックアウトマウスの解析を行った。

*Cmah* ノックアウトマウスでは T 細胞非依存性抗原に対する応答の亢進が見られた。*In vitro* での刺激実験において、ノックアウトマウスの B 細胞は野生型マウスの B 細胞に比べて増殖の亢進を示し、また、レトロウイルスによる発現系を用いて *Cmah* ノックアウトマウスの B 細胞に *Cmah* を強制発現させると増殖が低下したことから、Neu5Gc は B 細胞において、その増殖に対し抑制的に働いていると考えられた。細胞レベルでの増殖亢進という形での T 細胞非依存性抗原に対する B 細胞応答の亢進は、抗体産生というマウス個体レベルでの応答における亢進という結果と一致するものであり、この増殖の差が抗体産生の差を生んでいるのではないかと考えられた。

第二章で、B 細胞活性化の場である胚中心では、Neu5Gc の発現が抑制されていることを

明らかにした。また、GL7 の結合が Neu5Ac 特異的であるため、Neu5Gc から Neu5Ac へというシアル酸分子種の変化が生じた胚中心を GL7 が特異的に検出することを明らかにした。GL7 は、野生型マウスの胚中心の中でも主に dark zone を染めると考えられている(7)。Dark zone に存在する B 細胞 (centroblast) は、6~7 時間という速さで細胞分裂することが明らかにされている(22)。本章で Neu5Gc を含む糖鎖が B 細胞の増殖に対し抑制的に働くことが明らかとなったことから、胚中心 B 細胞が Neu5Gc の発現を抑えることで高い増殖能を獲得している可能性が示唆された。さらに、B 細胞は、分化の途中でも一時 GL7 陽性となる。骨髓に存在する B 細胞のうち、GL7 陰性細胞では細胞周期の S/G<sub>2</sub>M 期に属する細胞は 5%以下であるのに対し、GL7 陽性細胞 (大型プレ B 細胞) はその約 45%が S/G<sub>2</sub>M 期に属するという報告がある(43)。大型プレ B 細胞はプレ B 細胞受容体からのシグナルにより細胞増殖が誘導されることから、GL7 エピトープの発現と増殖との関係が示唆されていた。プレ B 細胞段階で見られる GL7 エピトープの発現も、やはり Neu5Gc の減少を意味しており、その結果 GL7 陽性である大型プレ B 細胞は高い増殖能を獲得しているのかもしれない。今後、B 細胞特異的に *Cmah* を発現するトランスジェニックマウスを用いた研究を行い、Neu5Gc の減少の阻害がもたらす影響を調べることにより、B 細胞における Neu5Gc の生理的機能をさらに詳しく検討することが可能であると思われる。

それでは、*Cmah* ノックアウトマウスで B 細胞の増殖亢進をもたらす原因となっている分子は何であろうか？ *Cmah* 遺伝子の欠失により変化が生じるのは、シアル酸の 5 位の修飾基中の酸素原子一つだけである。シアル酸が付加されなくなるなど、シアル酸の量そのものが変化すると、シアル酸による修飾を受けるタンパク質の安定化や代謝に影響する可能性があるが、*Cmah* ノックアウトマウスではこれらは変化していないと考えられる。したがって、*Cmah* の欠失は、この 5 位の修飾基中の酸素一つの違いを見分け、シアル酸の分子種特異的にシアロ糖鎖をリガンドとする分子にのみ影響していると思われた。そのような分子の候補として挙げられたのが、Siglec である。Siglec は、シアル酸のカルボキシル基を認識するアルギニンを含む免疫グロブリン V セットドメインを細胞外に持つ分子ファミリーである。脾臓から単離した B 細胞のみを用いた増殖の実験において、野生型マウスとノックアウトマウスで増殖に差が見られたことから、B 細胞上にリガンドとともに発現が見られる分子に注目したところ、CD22 が候補として考えられた。もちろん、未知のシアル酸結合分子によるリガンド認識に変化が生じている可能性もあるが、その機能の発現に糖鎖リガンドとの結合の関与が示唆されている CD22 のリガンド量が *Cmah* ノックアウトマウスで大きく減少していたことから、まず CD22 の関与を検討した。

CD22 についてはこれまでにノックアウトマウスが 4 系統作製されており(46, 48, 49, 53, 57)、比較的よく研究がなされているが、ノックアウトマウスの系統により表現型が全く異な



るなど、CD22 を介した B 細胞内シグナル伝達の制御機構に関しては未知の部分が多い。しかし、B 細胞受容体刺激時のカルシウム流入の亢進はすべてのノックアウトマウスで共通して見られる表現型である。また、CD22 が細胞内から細胞外へのカルシウムの放出を制御しているという報告もあり(8)、CD22 は細胞内カルシウム濃度の制御に関わっていると考えられている。CD22 の機能における糖鎖リガンドの役割に関しては、これまでにマウスモデルを用い二つの異なる側面から研究がなされている。一つは *St6gal1* 遺伝子をノックアウトすることによりリガンド側を欠失させたモデルであり(24)、もう一つは CD22 側に変異を導入し、糖鎖リガンドとの結合を阻害したノックインマウスモデルである(52)。*St6gal1* ノックアウトマウスでは B 細胞活性化の減弱が見られ、カルシウム流入が低下している。また、この *St6gal1* 欠失によるカルシウム流入の低下は *St6gal1*/CD22 ダブルノックアウトマウスで消失することから、CD22 を介したシグナルの変化によると考えられている(10, 20)。一方、変異 CD22 のノックインマウスを用いた研究では、リガンドとの結合が消失しても B 細胞受容体刺激時のカルシウム流入やチロシンのリン酸化に差が見られず、CD22 の機能にはリガンド依存的なものと非依存的なものがある可能性が示唆されている。*Cmah* ノックアウトマウスで見られた表現型は、一部これらのマウスモデルで見られる表現型と重なる部分があるものの、どちらのマウスモデルとも異なっている。したがって、*Cmah* ノックアウトマウスでは、CD22-糖鎖リガンド結合に対する影響だけでなく、その他のシアル酸結合分子を介したシグナルの変化が複雑にからみあった結果を見ているのかもしれない。さらに、CD22 以外の分子の関与の可能性だけでなく、*Cmah* ノックアウトマウスでは *St6gal1* ノックアウトマウスと異なり  $\alpha$ 2-6 結合の Neu5Ac を含む糖鎖は発現しているため、これが CD22 と弱いながらも相互作用し、両者での表現型の違いを生んでいる可能性も考えられる。また、*St6gal1* のノックアウトマウスでは CD22 のリガンドは完全に失われているものの、CD22 以外の様々な分子への影響が同時に生じている可能性も十分考えられる。*St6gal1* ノックアウトマウスと変異 CD22 のノックインマウスでも表現系が異なっており、CD22 の機能における糖鎖リガンドの役割はいまだ解明されていない。今後、CD22 をはじめとする関連遺伝子と *Cmah* とのダブルノックアウトマウスを作製することにより、Neu5Gc の欠失と CD22 の機能との関係が明らかにされ、さらに CD22 の機能における糖鎖リガンドの役割が解明されることが期待される。

ノックアウトマウスで見られた表現型に CD22 が関係しているかどうかはまだ分からないが、本研究により、CD22 リガンドの発現が実際に *in vivo* で制御されていることが明らかになった。B 細胞上には CD22 のリガンドとなりうる糖鎖が多く発現しているため、CD22 は通常、同一細胞上に存在する糖鎖リガンド（シスリガンド）と結合し（masking）、他の細胞上のリガンド（トランスリガンド）との結合は阻害されていると考えられている。胚中心 B

細胞では、Neu5Gc の発現減少によりシスリガンド量が減少し、その結果シスリガンドから外れた (unmasking) CD22 が T 細胞など他の細胞上の糖鎖 (トランスリガンド) を認識できるようになり、細胞間の相互作用において大きな役割を担っている可能性も考えられる。*In vitro* で活性化させたヒト B 細胞で、CD22 がシスリガンドから外れるという報告もあり (55)、CD22 リガンドの発現調節が、B 細胞の活性化において重要な役割を担っていることが示唆される。また、第一章、第二章で GL7 が  $\alpha$ 2-6 結合の Neu5Ac をエピトープとして認識することを明らかにしたが、活性化 B 細胞における GL7 エピトープの発現は、CD22 リガンドの減少を意味する。つまり、胚中心で GL7 に認識される細胞表面タンパク質は、B 細胞が活性化していないときには Neu5Gc を含んでいるため CD22 と結合しているが、活性化時にはシアル酸の修飾の変化により、CD22 と結合できなくなる分子、つまり、CD22 の機能に関わる真のリガンド分子である可能性がある。CD22 自身にも糖鎖が付加されており、他の CD22 分子と結合するなど (21)、CD22 と糖鎖依存的に結合しうる分子は数多く存在する。それらの中から「真」のリガンドを見つけ出す上で、GL7 の結合の変化が大きな鍵となるかもしれない。

興味深いことに、Neu5Gc はヒトと最も近縁の動物種であるチンパンジーにおいても主要シアル酸分子種であるにも関わらず、ヒトでは *CMAH* 遺伝子に変異が生じているためその発現が見られない (9, 26, 68)。それどころか、ヒトでは Neu5Gc は免疫原性を示す (37)。また、シアル酸は微生物による宿主細胞の認識に用いられることも多く、進化論的な考え方をすると、ヒトが Neu5Ac のみを持つようになったのは Neu5Gc を認識する微生物による感染から逃れるためである、という仮説も考えられる。筆者らの研究室で作製した *Cmah* ノックアウトマウスは、シアル酸分子種に関してヒト型の発現を示すものであり、Neu5Gc の持つ免疫原性やシアル酸を標的分子とする感染症に関する研究において、ヒト型動物モデルとして有用であると考えられる。

## 第八節 実験方法

### 試薬

ほとんどの試薬類は Wako Chemical (Japan) および Nacalai Tesque (Japan) から購入した。

### 抗体およびレクチン

R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated anti-mouse B220 (RA3-6B2)、R-PE-conjugated



streptavidin、R-PE-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG-Fc は CALTAG Laboratories (USA) から、FITC-conjugated anti-mouse B220 (RA3-6B2)、R-PE-conjugated anti-mouse I-A/I-E (M5/114.15.2)、FITC-conjugated GL7 は BD PharMingen から、R-PE-conjugated anti-mouse IgM (1B4B1)、Biotin-conjugated anti-CD22 (2D6)、alkaline phosphatase-conjugated isotype-specific goat anti-mouse IgA, IgG1, IgG3, IgM、unlabeled isotype-specific goat anti-mouse IgA, IgG3、anti-CD40 は Southern Biotechnology Associates (USA) から、anti-mouse polyvalent Igs、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated PT-66 (抗リン酸化チロシン抗体) は Sigma (USA) から、rabbit anti-mouse CD22 serum は Chemicon (USA) から、HRP-conjugated donkey F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit Ig は Amersham Life Science (UK) から、anti-IκBα、anti-actin は Santa Cruz Biotechnology (USA) から、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG、HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG は ZYMED (USA) から購入した。Anti-CD22 モノクローナル抗体 Cy34.1 は、ハイブリドーマ Cy34.1 (ATCC) の培養上清より精製した。Biotinylated *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA) は HONEN (Japan) より購入した。

## マウス

*Cmah* ノックアウトマウスは、C57BL6/J に戻し交配を行い使用した。マウスは SPF (specific pathogen-free) 環境下で飼育した。

## フローサイトメトリー

第一章に記した方法に従って行った。

## 抗体産生の測定

8 週齢のマウスに対し、免疫前血清を採取後、免疫を行った。T 細胞依存性抗原による免疫では、初回免疫にはフロインド完全アジュバントを加えた dinitrophenyl (DNP)-keyhole limpet hemocyanin (KLH) 100 μg を、追加免疫には不完全アジュバントを加えた DNP-KLH を用い、腹腔内注射により免疫した。T 細胞非依存性抗原による免疫には PBS に懸濁させた DNP-Ficoll 10 μg を抗原として用いた。一週間ごとに採血を行い、得られた血清サンプルを DNP-BSA でコートした ELISA プレートに加えてインキュベートし、プレートに結合した抗 DNP 抗体量を ELISA 法により測定した。プレートに結合した抗 DNP 抗体の検出には、アルカリフォスファターゼ標識された、マウス免疫グロブリンの各アイソタイプ特異的な抗体を用い、*p*-nitrophenyl phosphate を基質として 1420 ARVO SXc

luminometer (Wallac, Finland) により 405 nm の吸光度を測定した。また、DNP-KLH で免疫したマウスの血清の混合プールをスタンダードとして使用し、このスタンダードの値をもとに、異なる ELISA プレート間での結果の補正等を行った。

### 脾臓 B 細胞の調製

マウスから摘出した脾臓をセルストレイナーを用いてすりつぶした後、ACK lysis buffer (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) で赤血球を溶血させ、脾臓細胞を調製した。この脾臓細胞の懸濁液に CD90 (Thy 1.2) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany) を加えてインキュベートし、MACS depletion column (Miltenyi Biotec) を用いて Thy1.2 陽性細胞を除くことにより、T 細胞を除去した。得られた Thy1.2-depleted fraction については、抗 B220 抗体で染色してフローサイトメトリーを行い、B 細胞の割合を確認した。

B 細胞の調製および培養には、血清、ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen, USA)、非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen)、L-グルタミン、2-メルカプトエタノール、カナマイシンを添加した RPMI1640 培地 (Invitrogen) を用いた。また、血清は基本的にウシ胎児血清 (FBS; JRH, USA) を用いたが、FBS 中には Neu5Gc が 3%程度存在することから、血清中の Neu5Gc の影響を排除するため、一部の実験では FBS の代わりに Neu5Gc を含まないトリ血清 (chicken serum; JRH) を用いた。

### B 細胞の増殖の測定

RPMI1640 培地で  $1 \times 10^5$  cells/ml に調製した脾臓 B 細胞を、96 穴プレートに 1 well あたり 100  $\mu\text{l}$  ずつ入れ、anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> fragment、anti-CD40、LPS (*Salmonella enterica*)、TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate)、ionomycin などを加えて刺激を行った。24 時間培養後、bromodeoxyuridine (BrdU) を添加し、さらに一晩培養を続けた。細胞内に取り込まれた BrdU の量は、chemiluminescent ELISA system (Roche Diagnostic GmbH, Germany) により測定した。発光の検出には、1420 ARVO SXc luminometer (Wallac, Finland) を用いた。

### レトロウイルスの作製と感染

レトロウイルスの作製および感染は第二章に記した方法に準じて行った。

LPS で刺激した脾臓 B 細胞にレトロウイルス (MSCV) を用いて *Cmah* を発現させ、ウイルス感染細胞を MACS システムにより回収し、前述のとおり B 細胞増殖を測定した。

### RT-PCR による Siglec の発現確認

X16c8.5 細胞から total RNA を調製し、逆転写反応により cDNA を得た。得られた cDNA を鋳型として、下記のプライマーを用いて PCR を行った。

- Siglec-1*; PS-mSn-2, 5'-GCTCAAAGACTTGAAGCCTG-3'  
PS-mSn-B, 5'-AGGCTGACTTGCTTCTCCTG-3'
- Siglec-2*; PS-mCD22-6, 5'-CCTCCACTCCTCAGGCCAGA-3'  
PG-mCD22-H, 5'-TGGCCACTGGAATTTTCCTG-3'
- Siglec-3*; PS-mCD33-1, 5'-GCTGTTCTTGCTGTGTGCAG-3'  
PS-mCD33-A, 5'-ACTGGAGAGTCTTCATGGAG-3'
- Siglec-4*; PS-mMAG-1, 5'-GCACACAAGTGGTCCATGAG-3'  
PS-mMAG-A, 5'-CACAATGTTGGGGGTGTTG-3'
- Siglec-E*; PS-mSiglecE-1, 5'-AGAAGAGGTTGACTGACTGG-3'  
PS-mSiglecE-A, 5'-GTTACAACCAGAGTCATCTTG-3'
- Siglec-F*; PS-mSiglecF-1, 5'-TGGCTACAAATGACCCACAG-3'  
PS-mSiglecF-A, 5'-GGGTAGATGTGACTTGGATG-3'
- Siglec-G*; PS-mSiglecG-1, 5'-TACAGGTGCAGAGAATTGTG-3'  
PS-mSiglecG-A, 5'-CTCCCCACTGAACATCTTTG-3'
- Siglec-H*; PS-m6430-1, 5'-GAACAGGTGGTCAGATGCTG-3'  
PS-m6430-A, 5'-GGTCTGTCACATGCACAGAG-3'

### Siglec-Fc プローブの作製

Siglec-Fc プローブの作製については、第一章に記した。

### 免疫組織染色

マウスの免疫および脾臓の凍結切片の作製は、第二章に記した方法に準じて行った。

### CD22 のウエスタンブロッティングと免疫沈降

脾臓 B 細胞を RPMI1640 培地で  $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l に調製し、37°C でプレインキュベート後、anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> fragment (10  $\mu$ g /  $5 \times 10^5$  cells) を加えて 37°C で刺激した。タンパク質のチロシンリン酸化の検出では、SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 2% SDS, 0.1% pyronin G, 10% glycerol, 2-mercaptoethanol) に細胞を溶解させ、ウエスタンブロッティングのサンプルとした。CD22 の免疫沈降の実験では、細胞を NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 25 mM HEPES [pH 7.4], 5 mM NaF, 2 mM sodium

orthovanadate, protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque, Japan]) に溶解させ、抗 CD22 (Cy34.1)抗体と Protein G Sepharose beads (Amersham Biostudies) を用いて CD22 の免疫沈降を行った。

これらのサンプルについてウエスタンブロッティングを行い、PT-66 抗体によりタンパク質のチロシンリン酸化を検出した。CD22 の免疫沈降実験では、リン酸化チロシンの検出後、抗 CD22 ポリクローナル抗体でリプローブすることにより CD22 を検出した。

ウエスタンブロッティングによるバンド検出の基質には、SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent substrate (Pierce, USA) を用い、X 線フィルムに感光させてシグナルを検出した。

#### カルシウム流入の測定

RPMI1640 培地に懸濁した脾臓 B 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) を  $1 \mu\text{M}$  Indo 1-AM (Dijindo, Japan) で  $37^\circ\text{C}$ 、30 分間標識後、Hanks' balanced Salt Solution (Invitrogen, USA) に懸濁させた。この細胞懸濁液 2.5 ml をクオートスキュベットに入れ、 $37^\circ\text{C}$  で 5 分間インキュベートした後、anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> fragment を加えて刺激を行った。タイムラプス蛍光検出器 RF-1500 (Shimadzu, Japan) で励起波長 338 nm、蛍光波長 405 および 485 nm の蛍光を測定し、ジギトニンで透過化処理を行った時の値と EGTA 処理を行った時の値を用いて、カルシウムバックプログラム (Shimadzu) により細胞内カルシウム濃度の変化の計算を行った。

#### I $\kappa$ B $\alpha$ の検出

脾臓 B 細胞を RPMI1640 培地で  $1 \times 10^6$  cells/ml に調製し、タンパク質の新規合成を阻害するためシクロヘキシミド ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) で  $37^\circ\text{C}$ 、30 分間処理した後、anti-IgM F(ab)<sub>2</sub> fragment ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) を加えた。 $37^\circ\text{C}$  で各時間刺激後細胞を回収し、PBS(-)で洗浄して lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA [pH 8.0], protease inhibitor cocktail [Nacalai Tesque, Japan]) に溶解させた。得られたサンプルについてウエスタンブロッティングを行い、Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque) を基質として用いて、LAS3000 (Fujifilm, Japan) によりシグナルを検出した。

## 結論

本研究により、以下の知見を得た。

- 活性化 B、T 細胞および胚中心のマーカーであるモノクローナル抗体、GL7 が、*N*-結合型糖鎖上の Neu5Ac $\alpha$ 2-6LacNAc という糖鎖構造をエピトープとして認識することを明らかにした。
- マウスの胚中心 B 細胞では、Neu5Ac から Neu5Gc への変換を担う酵素、Cmah の発現抑制により、主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へと変化することを明らかにした。
- 胚中心における Neu5Gc から Neu5Ac へというシアル酸分子種の変化により、胚中心では CD22 のリガンドが失われることを明らかにした。
- Neu5Gc 含有糖鎖が B 細胞活性化の負の制御に関わることを明らかにした。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えて頂き、終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学大学院生命科学研究科小堤保則教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究に際し直接丁寧な御指導を賜りました京都大学大学院生命科学研究科竹松弘准教授に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究遂行にあたり多大な御協力、御助言を賜りました立命館大学糖鎖工学研究センター川崎敏祐教授、京都大学大学院医学研究科岡昌吾教授、京都大学ゲノム医学センター菅井学助教、南部由希子博士に謹んで感謝致します。マイクロアレイによる解析は、理化学研究所フロンティア生体超分子システム研究グループ糖鎖発現制御研究チーム山本晴美氏、藤縄玲子氏、京都大学大学院薬学研究科統合薬学フロンティア教育センター奥野恭史准教授、京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野辻本豪三教授に行っていただきました。ここに心より感謝の意を表します。

最後になりましたが、本研究を支えて下さいました京都大学大学院生命科学研究科システム機能学分野、京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野、理化学研究所フロンティア生体超分子システム研究グループの皆様に深く感謝致します。

## 引用文献

1. **Angata, T., and A. Varki.** 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**:439-69.
2. **Barkett, M., and T. D. Gilmore.** 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**:6910-24.
3. **Barrachina, M., E. Gonalons, and A. Celada.** 1999. LPS upregulates MHC class II I-A expression in B lymphocytes at transcriptional and at translational levels. *Tissue Antigens* **54**:461-70.
4. **Bast, B. J., L. J. Zhou, G. J. Freeman, K. J. Colley, T. J. Ernst, J. M. Munro, and T. F. Tedder.** 1992. The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Cell Biol* **116**:423-35.
5. **Baum, L. G., K. Derbin, N. L. Perillo, T. Wu, M. Pang, and C. Uittenbogaart.** 1996. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J Biol Chem* **271**:10793-9.
6. **Blixt, O., B. E. Collins, I. M. van den Nieuwenhof, P. R. Crocker, and J. C. Paulson.** 2003. Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* **278**:31007-19.
7. **Cervenak, L., A. Magyar, R. Boja, and G. Laszlo.** 2001. Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol Lett* **78**:89-96.
8. **Chen, J., P. A. McLean, B. G. Neel, G. Okunade, G. E. Shull, and H. H. Wortis.** 2004. CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nat Immunol* **5**:651-7.
9. **Chou, H. H., H. Takematsu, S. Diaz, J. Iber, E. Nickerson, K. L. Wright, E. A.**

- Muchmore, D. L. Nelson, S. T. Warren, and A. Varki.** 1998. A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11751-6.
10. **Collins, B. E., B. A. Smith, P. Bengtson, and J. C. Paulson.** 2006. Ablation of CD22 in ligand-deficient mice restores B cell receptor signaling. *Nat Immunol* **7**:199-206.
  11. **Crocker, P. R.** 2004. CD33-related siglecs in the immune system. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **16**:357-70.
  12. **Crocker, P. R., and A. Varki.** 2001. Siglecs in the immune system. *Immunology* **103**:137-45.
  13. **Crocker, P. R., and A. Varki.** 2001. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol* **22**:337-42.
  14. **Cyster, J. G., and C. C. Goodnow.** 1997. Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues from antigens and the microenvironment. *Immunity* **6**:509-17.
  15. **Demetriou, M., M. Granovsky, S. Quaggin, and J. W. Dennis.** 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* **409**:733-9.
  16. **Edwards, D.** 2003. Non-linear normalization and background correction in one-channel cDNA microarray studies. *Bioinformatics* **19**:825-33.
  17. **Ellgaard, L., and A. Helenius.** 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* **13**:431-7.
  18. **Epstein, A. L., R. J. Marder, J. N. Winter, and R. I. Fox.** 1984. Two new monoclonal antibodies (LN-1, LN-2) reactive in B5 formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with follicular center and mantle zone human B lymphocytes and derived tumors. *J Immunol* **133**:1028-36.
  19. **Fukumoto, S., T. Mutoh, T. Hasegawa, H. Miyazaki, M. Okada, G. Goto, K. Furukawa, and T. Urano.** 2000. GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J Biol Chem* **275**:5832-8.
  20. **Ghosh, S., C. Bandulet, and L. Nitschke.** 2006. Regulation of B cell development and B cell



- signalling by CD22 and its ligands alpha2,6-linked sialic acids. *Int Immunol* **18**:603-11.
21. **Han, S., B. E. Collins, P. Bengtson, and J. C. Paulson.** 2005. Homomultimeric complexes of CD22 in B cells revealed by protein-glycan cross-linking. *Nat Chem Biol* **1**:93-7.
  22. **Hanna, M. G., Jr.** 1964. An Autoradiographic Study of the Germinal Center in Spleen White Pulp During Early Intervals of the Immune Response. *Lab Invest* **13**:95-104.
  23. **Hathcock, K. S., C. E. Pucillo, G. Laszlo, L. Lai, and R. J. Hodes.** 1995. Analysis of thymic subpopulations expressing the activation antigen GL7. Expression, genetics, and function. *J Immunol* **155**:4575-81.
  24. **Hennet, T., D. Chui, J. C. Paulson, and J. D. Marth.** 1998. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:4504-9.
  25. **Imai, Y., T. Fukui, A. Ikegaya, T. Ishikawa, Y. Ono, and K. Kurohane.** 2002. Lack of Shiga-like toxin binding sites in germinal centres of mouse lymphoid tissues. *Immunology* **105**:509-14.
  26. **Irie, A., S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, and A. Suzuki.** 1998. The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* **273**:15866-71.
  27. **Ishikawa, S., C. Kowal, B. Cole, C. Thomson, and B. Diamond.** 1995. Replacement of N-glycosylation sites on the MHC class II E alpha chain. Effect on thymic selection and peripheral T cell activation. *J Immunol* **154**:5023-9.
  28. **Kannagi, R.** 2002. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol* **12**:599-608.
  29. **Katagiri, Y. U., S. Kijimoto-Ochiai, T. Hatae, and H. Okuyama.** 1989. Type analysis of oligosaccharide chains on human and murine MHC class II alpha chains by the lectin-nitrocellulose sheet method. *Comp Biochem Physiol B* **93**:259-63.
  30. **Kawano, T., S. Koyama, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Kawasaki, S. Kawashima, T. Kawasaki, and A. Suzuki.** 1995. Molecular cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase. Regulation of species- and tissue-specific expression of N-glycolylneuraminic acid. *J Biol Chem* **270**:16458-63.

31. **Kawano, T., Y. Kozutsumi, T. Kawasaki, and A. Suzuki.** 1994. Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates. Purification and characterization of the key enzyme of the cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylation system. *J Biol Chem* **269**:9024-9.
32. **Kelm, S., A. Pelz, R. Schauer, M. T. Filbin, S. Tang, M. E. de Bellard, R. L. Schnaar, J. A. Mahoney, A. Hartnell, P. Bradfield, and et al.** 1994. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* **4**:965-72.
33. **Kniep, B., K. Schakel, M. Nimtz, R. Schwartz-Albiez, M. Schmitz, H. Northoff, R. Vilella, M. Gramatzki, and E. P. Rieber.** 1999. Differential expression of alpha2-6 sialylated polylactosamine structures by human B and T cells. *Glycobiology* **9**:399-406.
34. **Koyama, S., T. Yamaji, H. Takematsu, T. Kawano, Y. Kozutsumi, A. Suzuki, and T. Kawasaki.** 1996. A naturally occurring 46-amino acid deletion of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase leads to a change in the intracellular distribution of the protein. *Glycoconj J* **13**:353-8.
35. **Laszlo, G., K. S. Hathcock, H. B. Dickler, and R. J. Hodes.** 1993. Characterization of a novel cell-surface molecule expressed on subpopulations of activated T and B cells. *J Immunol* **150**:5252-62.
36. **Lee, E. U., J. Roth, and J. C. Paulson.** 1989. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem* **264**:13848-55.
37. **Martin, M. J., A. Muotri, F. Gage, and A. Varki.** 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* **11**:228-32.
38. **Michele, D. E., R. Barresi, M. Kanagawa, F. Saito, R. D. Cohn, J. S. Satz, J. Dollar, I. Nishino, R. I. Kelley, H. Somer, V. Straub, K. D. Mathews, S. A. Moore, and K. P. Campbell.** 2002. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* **418**:417-22.
39. **Miller, C., G. Kelsoe, and S. Han.** 1994. Lack of B7-2 Expression in the Germinal Centers of

Aged Mice. Aging: Immunol. Infectious Dis. **5**:249-257.

40. **Mitsuda, T., K. Furukawa, S. Fukumoto, H. Miyazaki, and T. Urano.** 2002. Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. *J Biol Chem* **277**:11239-46.
41. **Morita, S., T. Kojima, and T. Kitamura.** 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**:1063-6.
42. **Muramatsu, T.** 2000. Essential roles of carbohydrate signals in development, immune response and tissue functions, as revealed by gene targeting. *J Biochem (Tokyo)* **127**:171-6.
43. **Murasawa, M., S. Okada, S. Obata, M. Hatano, H. Moriya, and T. Tokuhsa.** 2002. GL7 defines the cycling stage of pre-B cells in murine bone marrow. *Eur J Immunol* **32**:291-8.
44. **Niir, H., and E. A. Clark.** 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**:945-56.
45. **Nitschke, L.** 2005. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* **17**:290-7.
46. **Nitschke, L., R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler, and M. C. Lamers.** 1997. CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* **7**:133-43.
47. **Novoradovskaya, N., M. L. Whitfield, L. S. Basehore, A. Novoradovsky, R. Pesich, J. Usary, M. Karaca, W. K. Wong, O. Aprelikova, M. Fero, C. M. Perou, D. Botstein, and J. Bramer.** 2004. Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics* **5**:20.
48. **O'Keefe, T. L., G. T. Williams, S. L. Davies, and M. S. Neuberger.** 1996. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* **274**:798-801.
49. **Otipoby, K. L., K. B. Andersson, K. E. Draves, S. J. Klaus, A. G. Farr, J. D. Kerner, R. M. Perlmutter, C. L. Law, and E. A. Clark.** 1996. CD22 regulates thymus-independent responses and the lifespan of B cells. *Nature* **384**:634-7.
50. **Otipoby, K. L., K. E. Draves, and E. A. Clark.** 2001. CD22 regulates B cell

- receptor-mediated signals via two domains that independently recruit Grb2 and SHP-1. *J Biol Chem* **276**:44315-22.
51. **Poe, J. C., M. Fujimoto, P. J. Jansen, A. S. Miller, and T. F. Tedder.** 2000. CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* **275**:17420-7.
  52. **Poe, J. C., Y. Fujimoto, M. Hasegawa, K. M. Haas, A. S. Miller, I. G. Sanford, C. B. Bock, M. Fujimoto, and T. F. Tedder.** 2004. CD22 regulates B lymphocyte function in vivo through both ligand-dependent and ligand-independent mechanisms. *Nat Immunol* **5**:1078-87.
  53. **Poe, J. C., K. M. Haas, J. Uchida, Y. Lee, M. Fujimoto, and T. F. Tedder.** 2004. Severely impaired B lymphocyte proliferation, survival, and induction of the c-Myc:Cullin 1 ubiquitin ligase pathway resulting from CD22 deficiency on the C57BL/6 genetic background. *J Immunol* **172**:2100-10.
  54. **Rao, S. P., K. A. Vora, and T. Manser.** 2002. Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells. *J Immunol* **169**:1859-68.
  55. **Razi, N., and A. Varki.** 1998. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7469-74.
  56. **Rose, M. L., M. S. Birbeck, V. J. Wallis, J. A. Forrester, and A. J. Davies.** 1980. Peanut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature* **284**:364-6.
  57. **Sato, S., A. S. Miller, M. Inaoki, C. B. Bock, P. J. Jansen, M. L. Tang, and T. F. Tedder.** 1996. CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: altered signaling in CD22-deficient mice. *Immunity* **5**:551-62.
  58. **Schauer, R.** 1982. Sialic acids: Chemistry, Metabolism and Function. *Cell Biology Monographs*, Springer-Verlag, New York **10**.
  59. **Schulte, R. J., M. A. Campbell, W. H. Fischer, and B. M. Sefton.** 1992. Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation. *Science* **258**:1001-4.
  60. **Schwartz-Albiez, R., B. Dorken, P. Moller, N. T. Brodin, D. A. Monner, and B. Kniep.**

1990. Neutral glycosphingolipids of the globo-series characterize activation stages corresponding to germinal center B cells. *Int Immunol* **2**:929-36.
61. **Schwarzkopf, M., K. P. Knobloch, E. Rohde, S. Hinderlich, N. Wiechens, L. Lucka, I. Horak, W. Reutter, and R. Horstkorte.** 2002. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5267-70.
  62. **Shaffer, A. L., A. Rosenwald, E. M. Hurt, J. M. Giltzane, L. T. Lam, O. K. Pickeral, and L. M. Staudt.** 2001. Signatures of the immune response. *Immunity* **15**:375-85.
  63. **Shapiro-Shelef, M., K. I. Lin, L. J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M. G. McHeyzer-Williams, and K. Calame.** 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* **19**:607-20.
  64. **Suzuki, Y., T. Ito, T. Suzuki, R. E. Holland, Jr., T. M. Chambers, M. Kiso, H. Ishida, and Y. Kawaoka.** 2000. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* **74**:11825-31.
  65. **Tedder, T. F., J. Tuscano, S. Sato, and J. H. Kehrl.** 1997. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **15**:481-504.
  66. **Tsuji, S.** 1996. Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J Biochem (Tokyo)* **120**:1-13.
  67. **Varki, A.** 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* **2**:25-40.
  68. **Varki, A.** 2001. N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans. *Biochimie* **83**:615-22.
  69. **Varki, A.** 1992. Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. *Curr Opin Cell Biol* **4**:257-66.
  70. **Varki, A.** 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *Faseb J* **11**:248-55.
  71. **Varki, A., and T. Angata.** 2006. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* **16**:1R-27R.
  72. **Wakabayashi, C., T. Adachi, J. Wienands, and T. Tsubata.** 2002. A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science* **298**:2392-5.

73. **Weil, R., and A. Israel.** 2004. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **16**:374-81.
74. **Wuensch, S. A., R. Y. Huang, J. Ewing, X. Liang, and J. T. Lau.** 2000. Murine B cell differentiation is accompanied by programmed expression of multiple novel beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase mRNA forms. *Glycobiology* **10**:67-75.
75. **Yohannan, J., J. Wienands, K. M. Coggeshall, and L. B. Justement.** 1999. Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22. *J Biol Chem* **274**:18769-76.
76. **Yoshida, A., K. Kobayashi, H. Manya, K. Taniguchi, H. Kano, M. Mizuno, T. Inazu, H. Mitsuhashi, S. Takahashi, M. Takeuchi, R. Herrmann, V. Straub, B. Talim, T. Voit, H. Topaloglu, T. Toda, and T. Endo.** 2001. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* **1**:717-24.
77. **Zhang, J., I. C. MacLennan, Y. J. Liu, and P. J. Lane.** 1988. Is rapid proliferation in B centroblasts linked to somatic mutation in memory B cell clones? *Immunol Lett* **18**:297-9.